

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Marcadores predictivos de fibrosis y de respuesta al
tratamiento frente al virus de la hepatitis C (VHC) en
pacientes coinfectados por VIH y VHC**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Luisa Vargas

Directores

Salvador Resino García
Juan Berenguer Berenguer

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**“MARCADORES PREDICTIVOS DE FIBROSIS Y DE
RESPUESTA AL TRATAMIENTO FRENTE AL VIRUS
DE LA HEPATITIS C (VHC) EN PACIENTES
COINFECTADOS POR VIH Y VHC”**

Ana Luisa Vargas

Tesis Doctoral

Directores:

Dr. Salvador Resino García.

Dr. Juan Berenguer Berenguer.

Madrid, 2014



El Dr. Salvador Resino García, investigador Titular del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid); y el Dr. Juan Berenguer Berenguer, Consultor del Servicio de Enfermedades Infecciosas/VIH (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid)

Certifican:

Que el trabajo titulado **"Marcadores predictivos de fibrosis y de respuesta al tratamiento frente al virus de la hepatitis C (VHC) en pacientes coinfectados por VIH y VHC** ha realizado por Dña. Ana Luisa Vargas en las instalaciones del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor.

Y para que así conste lo firmamos en Madrid, a 15 de octubre de 2014.

Dr. Salvador Resino García
Doctor en Ciencias Biológicas
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda (Madrid)

Dr. Juan Berenguer Berenguer
Doctor en Medicina
Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón
Madrid

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas (EMEI) del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) con una beca del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT, Venezuela) y la financiación concedida por la Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) (Ref. 36650/07) y el Instituto de Salud Carlos III (Ref. PI07/90201; Ref.: UIPY 1467/07)

A todos los enfermos de SIDA

Gracias a Dios y a mi madre

Agradecimientos

Al finalizar este camino, siento el deber de detenerme y mirar atrás y no puedo dejar de recordar todo lo que hizo posible la culminación de este proyecto.

Antes que todo quiero comenzar por dar Gracias a Dios y a mis Padres Pablo y Luisa por darme la vida, ya que sin ellos no hubiese sido posible mi existencia, son mi referencia de vida.

Gracias a todos mis maestros y profesores que a lo largo de mi vida han estado presentes siendo un pilar fundamental en mi aprendizaje.

Gracias a mis Directores de Tesis Dr. Salvador Resino, Salva, por toda la confianza depositada en mí, por su paciencia y sus enseñanzas, por permitirme entrar en su grupo de investigación y por ayudarme a culminar este proyecto de Tesis Doctoral. Y al Dr. Juan Berenguer por todo el aporte científico y sus sabios consejos a lo largo de este camino.

Gracias al personal del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital Universitario "Gregorio Marañón" de Madrid, en especial dar las gracias a la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández por su interés y tiempo, a Raquel Lorente por su colaboración en la recogida de datos y muestras; al Servicio de Medicina Interna, en especial a la Dra. Dariela Micheluod por su interés y ayuda; a la Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH, en especial, a la Dra. Pilar Miralles, al Dr. Juan Carlos López y al Dr. Jaime Cosín; a la Unidad de Investigación perteneciente a Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital "Gregorio Marañón", en especial a José María Bellón; al Departamento de Microbiología, en especial a la Dra. Pilar Catalán; al Departamento de Anatomía Patológica, en especial al Dr. Emilio Álvarez, al Servicio de Inmuno-Pediatría, en especial a la Dra. M^a Dolores Gurbindo y al Biobanco Español de VIH.

Gracias a mis compañeras Isa y Silvia del laboratorio de Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas (EMEI) del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).

Gracias a mis colegas y amigas Carmen y Luci que en la distancia física pero no espiritual me han dado su apoyo y aliento en todo momento.

A ti mi nano, por siempre estar, mano a mano, fortaleciendo cada día nuestra familia,

A mis niños Annette y Luis fuente de inspiración, que con sus risas y alegrías han matizado mis momentos de angustias.

A todos los que han estado y los que no.

A todos.... Muchas gracias!!!!

Summary

Title: Predictive markers of fibrosis and response to treatment against the Hepatitis C virus (HCV) in patients coinfecting with HIV and HCV

Author: Ana Luisa Vargas.

BACKGROUND

Staging liver fibrosis

Human immunodeficiency virus (HIV) infection influences the natural evolution of chronic hepatitis C (CHC) infection by accelerating fibrosis progression and increasing the rate of cirrhosis and end-stage liver disease in HIV/hepatitis C virus (HCV) coinfecting patients. Despite a decline in morbidity/mortality from opportunistic infections since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART), end-stage liver disease continues to be a frequent cause of hospitalization and death in patients coinfecting with HIV and HCV. For this reason, all HIV-infected individuals should be screened for HCV infection, and all individuals with positive results for HCV RNA should be candidates for anti-HCV treatment, provided that HIV infection is well controlled and there are no contraindications to therapy with interferon or ribavirin.

Staging liver fibrosis is considered to be an essential part in the management of patients with CHC, because it provides prognostic information and, in many cases, assists in therapeutic decisions. Patients with bridging fibrosis are at a high risk of developing cirrhosis in the ensuing decade, so there is little doubt that these patients as well as patients with established liver cirrhosis have a real need to initiate HCV antiviral therapy. The latter group of patients also needs more careful monitoring and additional diagnostic tests including periodic esophagogastroduodenoscopy to detect esophageal varices as well as imaging and other techniques to screen for hepatocellular carcinoma. The survival rate of HIV/HCV-co-infected patients with cirrhosis after the first episode of hepatic decompensation is extremely poor.

Liver biopsy is still considered the "reference standard" for the assessment of liver fibrosis. However, this procedure has several limitations, including its invasive nature that can lead to complications, inadequate biopsy size, intra- and inter-observer variability, tissue fragmentation, cost, and low acceptance by most patients. In recent years, these limitations have led to the development of alternative noninvasive procedures to measure the degree of liver fibrosis. These methods are currently divided into two main categories: imaging methods, such as transient elastography, and assays based on serum biomarkers. The potential advantages of these methods are that they are noninvasive, more

comfortable for patients and clinicians, and can be repeated periodically. Indirect markers associated with fibrosis such as routine biochemistry, and platelet analyses have been incorporated into several fibrosis indexes such as APRI, FIB-4, and Forns' indexes.

One of these blood markers is hyaluronic acid (HA), an essential component of the extracellular matrix in virtually every tissue of the body. In the liver, HA is mostly synthesized by hepatic stellate cells and degraded by sinusoidal endothelial cells. HA serum levels have been found to correlate with the histological stages of liver fibrosis in HCV monoinfected patients, and HA alone has shown very good diagnostic accuracy for the non-invasive assessment of fibrosis and cirrhosis.

Response to HCV antiviral therapy with peg-IFN- α + RBV

HIV/HCV co-infected patients treated with interferon- α and ribavirin (IFN- α +RBV) have difficulty achieving sustained virologic response (SVR). Finding effective predictive markers of HCV virologic response is one of the major challenges to increasing the effectiveness of HCV antiviral therapy.

Chemokines play a role in regulating leukocyte recruitment and trafficking, acting primarily as chemoattractants and activators of specific types of leukocytes such as T-cells (memory and activated T lymphocytes), which infiltrate the liver during chronic HCV infection. Furthermore, chemokines may also be involved in liver regeneration, fibrosis, and in malignant transformation, which can be induced by the persistence of inflammation. Recently, attention has been focused on determining the role of chemokines in response to IFN- α +RBV treatment during HCV infection.

IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) could play an important role in the pathogenesis of chronic HCV infection through the recruitment of effector Th1 lymphocytes to the liver parenchyma, potentially contributing to the host immune response against the virus as well as to disease progression. Recently, serum IP-10 levels prior to HCV-therapy have been associated with treatment response in HCV-infected patients.

OBJECTIVES

The aims were to identify peripheral blood biomarkers related to the innate immune response and liver fibrosis in patients coinfecting with HIV/HCV, for proposing:

1. Predictive markers of liver fibrosis and an algorithm that may be used as non-invasive test of hepatic fibrosis, and evaluating these markers compared to existing non-invasive indices.

2. Predictive markers of response to HCV therapy with peg-IFN- α + RBV in patients coinfecting with HIV and HCV.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The patients for this cross-sectional study came from the HIV outpatient clinic of the Hospital Gregorio Marañón in Madrid, Spain. Patients with documented HIV/HCV coinfection who underwent liver biopsies between May 2000 and May 2007 were included in the study. Liver biopsies were performed on patients who were potential candidates for HCV-therapy and had not received previous interferon therapy. The Inclusion criteria were: availability of a frozen serum sample collected on the day of liver biopsy, no clinical evidence of hepatic decompensate, detectable HCV RNA by polymerase chain reaction, negative hepatitis B surface antigen, CD4+ lymphocyte count higher than 200 cells/ μ L, stable antiretroviral therapy or no need for antiretroviral therapy, and the absence of diabetes, active opportunistic infections, or active drug or alcohol addiction. Data collection was planned for after the index test and reference standard were performed. In our cohort of patients, 297 HIV/HCV coinfecting patients had liver biopsy data by May 2007, but only 195 out 297 patients could be included because they also had had a serum sample collected and frozen. All work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave their written consent for the liver biopsy and the Institutional Ethics Committee approved the study.

Moreover, we carried out a retrospective study between July 2000 and February 2009. The eligibility criteria for anti-HCV therapy included the absence of prior hepatic decompensation, CD4+ T-cell count > 200 cells/mm³, stable antiretroviral therapy or no need for antiretroviral therapy, the absence of active opportunistic infections, and no active drug addiction. For the purpose of this study, we excluded patients who did not have a serum sample taken at baseline, had previously received IFN- α +RBV, had diabetes mellitus, had received HCV treatment for less than 24 weeks, or had their HCV treatment prematurely interrupted due to adverse events, abandonment, or loss of follow-up. During the study period, 264 HIV/HCV co-infected patients from our institution were treated for HCV infection with IFN- α +RBV. A total of 137 patients each had a plasma sample collected and frozen before initiation of interferon/ribavirin therapy, of which 28 (17%) had the treatment prematurely interrupted due to adverse events, abandonment, or loss of follow-

up. All patients gave their written consent for the liver biopsy and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Serum markers analyzed

In our study, serum markers were measured from a blood sample taken before liver biopsy. Multiplex suspension bead array immunoassay was performed using the Luminex 100™ analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) to identify protein expression in frozen serum samples according to the manufacturers' specifications.

Multiplex kits (LINCOplex™; LINCO Research, St. Charles, MO 63304, USA) were used to specifically evaluate the following markers: insulin, leptin, hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF), soluble Fas-associated death domain protein ligand (sFasL), soluble Fas-associated death domain protein (sFas), macrophage migration inhibitory factor (MIF), soluble intercellular adhesion molecule (sICAM), and soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM). A minimum of 100 events (beads) was collected for each protein sample, and median fluorescence intensities (MFI) were obtained. Analyte protein concentrations were automatically calculated based on standard curve data using MasterPlex™ QT Analysis version 2 (MiraiBio, Inc., Alameda, CA). A five-parameter regression formula was used to calculate the sample concentrations from the standard curves.

The plasma chemokines eotaxin (CCL11), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2), MCP-3 (CCL7), GRO- α (CXCL1), γ IP10 (CXCL10), and epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78 or CXCL5) were measured using Multiplex kits (Panomics Afymetrix, Inc.; Procarta® Protein Profiling Assays, Fremont, California, United States).

Through the use of commercially available reagents, we also tested via ELISA: Hyaluronic acid (HA, HA-ELISA; Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA), angiopoietin-II (Ang-2, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), and YKL-40 (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA).

In each patient, the degree of insulin resistance (IR) was estimated by the homeostatic model assessment method (HOMA) described by Matthews. In particular, an insulin resistance score (HOMA-IR) was obtained from samples acquired from fasting patients via the formula: plasma glucose (mmol/L) times serum insulin (mU/L) divided by 22.5.

Liver biopsy and histology

Liver biopsies were performed on an outpatient basis following the recommendations of the Patient Care Committee of the American Gastroenterological Association. Liver fibrosis was estimated following the criteria established by the METAVIR Cooperative Study Group. Fibrosis was scored as follows: F0, no fibrosis; F1, portal fibrosis; F2 periportal fibrosis or rare portal-portal septa; F3, fibrous septa with architectural distortion but with no obvious cirrhosis (bridging fibrosis); and F4, definite cirrhosis. The researchers in charge of evaluating the biopsies, interpreting the clinical data, or calculating and analyzing the reference standard all performed each function without knowledge of the results of the other evaluations.

FINDINGS/CONCLUSIONS

1. The diagnostic accuracy of serum HA levels increases gradually with the hepatic fibrosis stage. However, HA is better than other simple non-invasive indexes using parameters easily available in routine clinical practice only for the diagnosing of cirrhosis.
2. HA had a high VPN to discard cirrhosis (99%) but low PPV for confirmation (55%). Thus, The practical interest of HA to assess liver fibrosis in patients coinfecting with HIV and HCV is low.
3. We found that platelet count, ALP, HGF, TIMP-1, and HA were independent predictive markers of advanced fibrosis in HIV/HCV co-infected patients. The combination of these indirect with other direct markers of fibrosis in a logistic probability function yielded a new serum index that accurately predicted bridging fibrosis and cirrhosis.
4. HGM-3 better predicts the absence of fibrosis (97% certainty for $F < 3$ fibrosis) than the presence of significant fibrosis (77% certainty). HGM-3 improves upon the accuracy of other previously published indexes but still has limitations in accurately identifying patients with $F \geq 3$. This indicates that further research should be carried out to improve the ability of diagnosis of HIV/HCV patients with advanced fibrosis ($F \geq 3$).
5. Plasma IP-10 and eotaxin levels prior HCV-therapy may predict virologic response during and after HCV-therapy in difficult-to-treat HIV/HCV co-infected patients.
6. Quantification of chemokines provides information regarding the profile of immune response against HCV, and might play a role as markers of virologic response to HCV treatment.

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).....	2
1.1.1. Características del VIH.....	2
1.1.1.1. Estructura del VIH-1.....	2
1.1.1.2. Ciclo biológico del VIH.	5
1.1.1.3. Receptores virales: CD4 y receptores de quimioquinas.....	6
1.1.2. Variabilidad genética del VIH: tipos y subtipos.	9
1.1.3. Transmisión de la infección.	9
1.1.3.1. Transmisión por vía parenteral.	9
1.1.3.2. Transmisión por vía sexual.....	10
1.1.3.3. Transmisión por vía vertical.....	10
1.1.4. Epidemiología de la infección VIH.....	10
1.1.5. Historia natural de la infección por el VIH-1.	12
1.1.6. Respuesta inmune frente al VIH.	14
1.1.6.1. Respuesta humoral.....	14
1.1.6.2. Respuesta celular.....	15
1.1.6.3. Respuesta inmunitaria en pacientes no progresores.....	15
1.1.6.4. Mecanismo de escape viral.....	15
1.1.7. Terapias antirretrovirales contra el VIH.	16
1.1.7.1. Ciclo viral y agentes antirretrovirales.	16
1.1.7.2. Terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).....	19
1.1.7.3. Resistencias al tratamiento antirretroviral.	20
1.1.7.4. Terapia de rescate.	20
1.2. VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)	21
1.2.1. Características generales del VHC	21
1.2.2. Estructura y genoma del VHC.....	21
1.2.3. Ciclo de infección del VHC.....	23
1.2.4. Heterogeneidad genética del VHC.....	24
1.2.5. Epidemiología.....	25
1.2.5.1. Vías de transmisión del VHC.....	25
1.2.5.2. Genotipo viral.	26
1.2.6. Historia Natural de la Infección por VHC.....	27
1.2.6.1. Infección aguda.....	27
1.2.6.2. Infección crónica.....	28
1.2.6.3. Enfermedad hepática.....	29
1.2.7. Diagnóstico de fibrosis.	30
1.2.7.1. Biopsia hepática.....	30
1.2.7.2. Marcadores no invasivos de Fibrosis.	33
1.2.7.3. Cirrosis y hepatocarcinoma.	35

1.2.8.	<i>Tratamiento antiviral contra el VHC.</i>	35
1.2.9.	<i>Duración y seguimiento del tratamiento antiviral combinado.</i>	37
1.2.9.1.	Nuevas terapias antivirales frente al VHC.	39
1.2.9.2.	IL28B y respuesta al tratamiento frente al VHC.	39
1.3.	COINFECCIÓN VHC/VIH.	39
1.3.1.	<i>Tratamiento antiviral del VHC en pacientes coinfectados por VIH/VHC.</i>	40
1.3.2.	<i>Tratamiento antirretroviral del VIH en pacientes coinfectados por VIH/VHC.</i>	42
2.	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.	46
2.1.1.	<i>Test no invasivos de fibrosis hepática.</i>	46
2.1.2.	<i>Respuesta al tratamiento antiviral frente al VHC con peg-IFN-α+RBV.</i>	46
3.	HIPÓTESIS	47
4.	OBJETIVOS	47
5.	SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS	50
5.1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.	50
5.1.1.	<i>Pacientes coinfectados por VIH/VHC sin tratamiento antiviral frente al VHC.</i>	50
5.1.2.	<i>Pacientes coinfectados por VIH/VHC en tratamiento antiviral frente al VHC.</i>	51
5.2.	DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO.	52
5.3.	TÉCNICAS DE LABORATORIO.	52
5.3.1.	<i>Procesamiento de las muestras.</i>	52
5.3.2.	<i>Diagnóstico y seguimiento de la infección viral.</i>	52
5.3.3.	<i>Tests de la infección por el VIH.</i>	53
5.3.3.1.	Diagnóstico de la infección por el VIH.	53
5.3.3.2.	Marcadores de seguimiento de la infección por el VIH.	53
5.3.4.	<i>Tests de la infección por el VHC.</i>	54
5.3.4.1.	Diagnóstico de la infección por el VHC.	54
5.3.4.2.	Determinación del antígeno del core del VHC.	54
5.3.4.3.	Marcadores de seguimiento de la infección por el VHC.	55
5.3.5.	<i>Biopsia hepática.</i>	55
5.3.6.	<i>Análisis bioquímicos y hematológicos.</i>	56
5.3.7.	<i>Inmunoensayo.</i>	57
5.3.7.1.	Elisa multiplex en el analizador Luminex 100™.	57
5.3.7.2.	Elisa simple.	60
5.3.8.	<i>Análisis Estadístico</i>	61
5.3.8.1.	Test Ji cuadrado(x2) de Pearson.	61
5.3.8.2.	Pruebas estadísticas para comparar dos o más grupos.	61
5.3.8.3.	Coeficiente de correlación.	62
5.3.8.4.	Regresión.	62
5.3.8.5.	Rendimiento de una prueba diagnóstica.	63

6. PUBLICACIONES	68
6.1. CAN SERUM HYALURONIC ACID REPLACE SIMPLE NON-INVASIVE INDEXES TO PREDICT LIVER FIBROSIS IN HIV/HEPATITIS C COINFECTED PATIENTS?	68
6.2. DIAGNOSIS OF ADVANCED FIBROSIS IN HIV AND HEPATITIS C VIRUS-COINFECTED PATIENTS VIA A NEW NONINVASIVE INDEX: THE HGM-3 INDEX.	80
6.3. PLASMA INTERFERON-GAMMA-INDUCIBLE PROTEIN-10 CAN PREDICT VIROLOGIC RESPONSE TO HEPATITIS C VIRUS THERAPY IN HIV/HCV-COINFECTED PATIENTS WITH HCV GENOTYPE 1.	92
6.4. ASSOCIATION BETWEEN PLASMA LEVELS OF EOTAXIN (CCL-11) AND TREATMENT RESPONSE TO INTERFERON-ALPHA AND RIBAVIRIN IN HIV/HCV CO-INFECTED PATIENTS.	98
7. DISCUSIÓN	106
7.1. MÉTODOS NO INVASIVOS PARA EL DIAGNOSTICO DE FIBROSIS Y CIRROSIS HEPÁTICA EN PACIENTES COINFECTADOS CON EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y EL VIRUS DE HEPATITIS C (VHC).....	106
7.1.1. <i>Evaluación del Acido Hialurónico.</i>	106
7.1.2. <i>Índice no invasivo compuesto: HGM3.</i>	108
7.2. BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA VIROLÓGICA AL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN-A Y RIBAVIRINA EN PACIENTES COINFECTADOS CON VIH / VHC: EL INTERFERÓN γ -PROTEÍNA INDUCIBLE-10 (IP-10) Y EOTAXINA.....	111
7.2.1. <i>interferón γ-proteína inducible-10 (IP-10)</i>	111
7.2.2. <i>Eotaxina (CCL11)</i>	112
8. CONCLUSIONES	116
9. BIBLIOGRAFÍA	120

Abreviaturas

ADN	<i>Acido desoxirribonucleico</i>
Ag p24	<i>Antígeno p24</i>
AH	<i>Acido Hialurónico</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
ARV	<i>Antirretroviral</i>
ASGPR	<i>Asialoglicoproteínas</i>
CA	<i>Cápside</i>
CCR	<i>Receptor de quimiocinas</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CMSP	<i>Células mononucleares de sangre periférica</i>
CTL	<i>Linfocito T citotóxico</i>
CV	<i>Carga viral</i>
CXCR	<i>Receptor de CXC quimiocinas</i>
ELISA	<i>Ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima</i>
FAL	<i>Fosfatasa alcalina</i>
GOT/AST	<i>Transaminasa glutámico-oxaloacética/Aspartato aminotransferasa</i>
Gp	<i>Glicoproteína</i>
GPT/ALT	<i>Transaminasa glutámico-pirúvica/Alanino aminotransferasa</i>
Gro-α	<i>Melanoma Growth-Stimulatory Activity</i>
HBsAg	<i>Antígeno de superficie de la hepatitis B</i>
IC95%	<i>Intervalo de confianza del 95%</i>
IFN-g	<i>Interferón-gamma</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IN	<i>Integrasa</i>
INR	<i>Cociente internacional normalizado.</i>
IP	<i>Inhibidor de proteasa</i>
IRES	<i>Sitio interno de entrada del ribosoma</i>
Log₁₀	<i>Logaritmo en base 10</i>
LPV/r	<i>Lopinavir/ritonavir</i>
LTNP	<i>Individuos no progresores a largo plazo</i>
MA	<i>Matriz</i>
MCP-1	<i>Proteína inflamatoria de macrófagos 1</i>
MIP	<i>Proteína inflamatoria de macrófagos</i>
NC	<i>Nucleocápside</i>
NC	<i>No codificante</i>
NF-kB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NNRTI	<i>Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido</i>
NT	<i>No tratado</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>

P	<i>Nivel de significación estadística</i>
PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
Peg IFN-α	<i>Interferón-α pegilado</i>
Peg-IFN	<i>Interferón pegilado</i>
PR	<i>Proteasa</i>
r.p.m.	<i>Revoluciones por minuto</i>
RBV	<i>Ribavirina</i>
RR	<i>Riesgo relativo</i>
RT	<i>Retro-transcriptasa</i>
RT-PCR	<i>Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa</i>
SIDA	<i>Síndrome de inmunodeficiencia adquirida</i>
SU	<i>Glicoproteína de superficie</i>
RVS	<i>Respuesta Viroológica sostenida</i>
TAR	<i>Terapia antirretroviral</i>
TARGA	<i>Terapia antirretroviral de gran actividad</i>
TCR	<i>Receptor de linfocitos T</i>
TGF-β	<i>Factor de crecimiento tumoral β</i>
Th	<i>Respuesta T helper</i>
TM	<i>Glicoproteína transmembrana</i>
TNF	<i>Factor de necrosis tumoral</i>
TREC	<i>Círculos de escisión del receptor de células T</i>
UDVP	<i>Usuarios de drogas por vía parenteral</i>
VHA	<i>Virus de la hepatitis A</i>
VHB	<i>Virus de la hepatitis B</i>
VHC	<i>Virus de la Hepatitis C</i>
VIS	<i>Virus de Inmunodeficiencia en Simios</i>
γGT	<i>Gamma Glutamyltranspeptidasa.</i>

Introducción

1. Introducción

1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

1.1.1. Características del VIH.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Esta enfermedad se describió por primera vez en 1981 en varones jóvenes homosexuales que presentaban un cuadro de inmunodeficiencia caracterizado por la disminución de linfocitos T CD4+[1].

En 1983, investigadores del Instituto Pasteur de París aislaron un retrovirus a partir de nódulos linfáticos de un paciente, y lo denominaron virus de la linfadenopatía (LAV). Este virus era capaz de replicar y causar efectos citopáticos en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) [2]. Poco después, Gallo & cols.[3] y Levy & cols [4] aislaron un retrovirus a partir de muestras de pacientes con SIDA, al que denominaron HTLV-III. Finalmente se llegó a la conclusión de que estos tres virus eran el mismo, y se acordó llamarlo VIH [5]. Actualmente, el VIH, es un virus clasificado dentro de la familia *Retroviridae*, subfamilia *lentivirus* [6].

Los retrovirus pueden ser divididos en dos grupos: transformantes y citopáticos. Los primeros inducen cambios en el crecimiento celular y están asociados a cáncer. Los retrovirus citopáticos son miembros de la familia de lentivirus en donde están incluidos el VIH-1, VIH-2 y VIS [7]. Tienen como célula diana el linfocito T, con alta tasa de replicación, que presenta viremia libre y una alta variabilidad, que le permite escapar de la respuesta inmune [8].

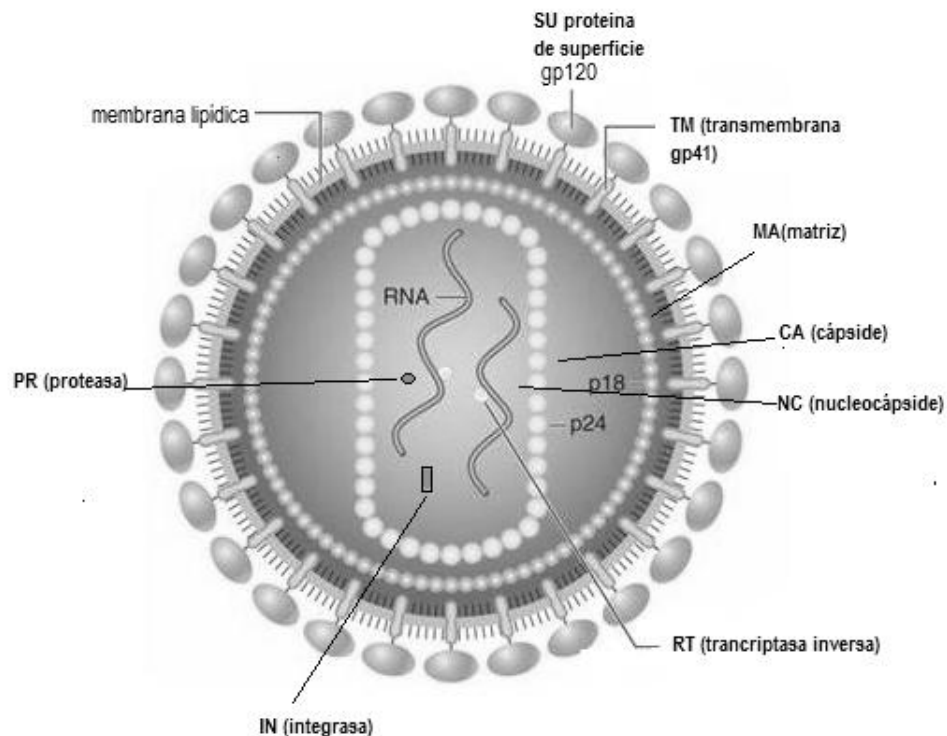
1.1.1.1. Estructura del VIH-1.

El VIH-1 es un retrovirus cuya estructura básica se ilustra de forma esquemática en la **figura 1**. Desde el punto de vista estructural, el VIH está formado por una partícula esférica de 100-120 nm, en la que se distinguen varios componentes [9, 10]: 1) Una envuelta formada por una glicoproteína de superficie (SU) y una proteína transmembrana (TM). 2) Una cápside que incluye las proteínas de la matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). 3) Enzimas esenciales para su replicación: transcriptasa inversa (RT), proteasa (PR) e integrasa (IN).

En el interior del virus se encuentran las proteínas de la matriz (p17), cápside (p24) y nucleocápside (p7). Dentro de la cápside viral, se localiza el material genético del virus constituido por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8

kb asociadas a las proteínas de la nucleocápside, las enzimas esenciales para la replicación del virus (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa) y las proteínas reguladoras y accesorias.

Figura 1. Estructura y genoma del VIH.



La envuelta está formada por una bicapa fosfolipídica procedente de la membrana plasmática de la célula infectada. Asociada a la bicapa hay dos glicoproteínas virales: gp120, proteína trimérica que sobresale hacia el exterior y permanece unida no covalentemente a la proteína gp41 que se encuentra anclada a la bicapa lipídica por una región transmembrana [11]. En el interior de la envuelta se alinea la proteína de la matriz p17.

La cápside está formada por la proteína p24. En su interior se aloja el genoma viral, dos copias idénticas de ARN que están recubiertas por la proteína p9, una molécula de ARN transferente que actúa como cebador en la iniciación de las síntesis del ADN viral, y otras enzimas necesarias para su replicación como la transcriptasa inversa, la integrasa, la proteasa y la proteína p6 [12].

El material genético del virus se localiza en el interior de la cápside viral, codifica la información para la síntesis de las proteínas virales y presenta una longitud aproximada de 9,2 kb [10]. El ARN viral comprende las secuencias repetidas situadas en los extremos del

genoma (LTR) y nueve genes: seis reguladores (tat, rev, nef, vif, vpr y vpu) y tres estructurales (gag, pol y env) [13, 14] (**Figura 2, Tabla 1**).

Figura 2. Estructura del genoma de VIH. (Adaptado de <http://medstat.med.utah.edu>)

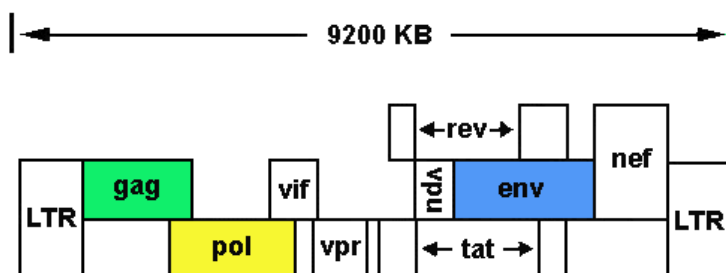


Tabla 1. Genes del VIH y propiedades de las proteínas que codifican.

Gen	Proteínas	Función
Env	gp160	Precursor preproteico.
	gp120 (SU)	Proteína estructural que forma la envuelta. Se une al receptor CD 4. Implicada en la fusión de las membranas
	gp41 (TM)	
Gag	p24 (CA)	Proteína de la nucleocápside
	p17 (MA)	Proteína de la matriz
	p7 (NC)	Forma la nucleocápside
Pol	PR	Enzima proteasa. Implicada en la maduración del virión
	RT	Enzima Transcriptasa Inversa. Cataliza el paso de ARN a ADN
	IN	Enzima Integrasa. Implicada en la integración del ds-ADN sintetizado en el genoma del huésped.
Tat	Tat	Factor viral de trasactivación transcripcional. Proteína reguladora esencial para la replicación del virus.
Rev	Rev	Es una fosfoproteína. Promueve el transporte y estabilización del ARNm entre núcleo y citoplasma.
Nef	Nef	Regulación negativa de CD4 y HLA de clase I. Aumento de la infectividad vírica Incremento de la retrotranscripción.
Vif	Vif	Aumenta la infectividad vírica.
Vpr	Vpr	Transactivador vírico. Inducción de apoptosis. Transporte del complejo de preintegración.
Vpu	Vpu	Aumenta la liberación de viriones.
Tev	Tev	Activador de tat y rev

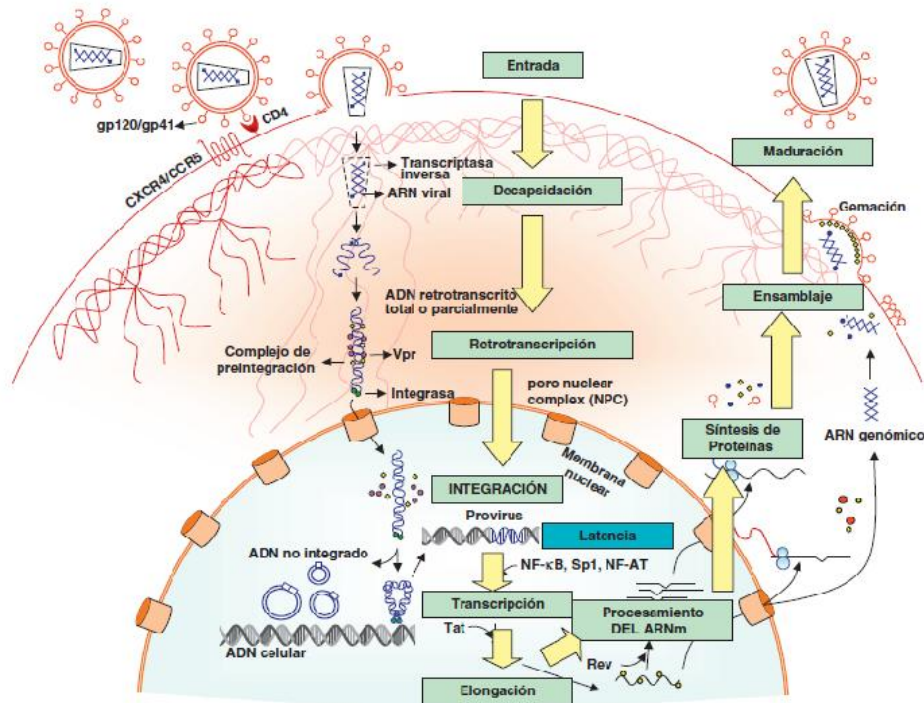
1.1.1.2. Ciclo biológico del VIH.

Para iniciar la infección, el VIH entra a la célula mediante la **fusión** de su envuelta con la membrana celular. La glicoproteína de la envuelta **gp120** se une específicamente al receptor, que se encuentra en la superficie celular [15]. El principal receptor es el **CD4** presente en linfocitos **T-CD4+** y monocito/macrófagos. La interacción entre la **gp120** (en forma de trímero) y el **CD4** ocasiona diversos cambios conformacionales en la **gp120** que resultan en la exposición de epítomos conservados que se encontraban ocultos, los cuales se unen a un segundo receptor, (o correceptor), que pertenece a la familia de las quimiocinas, generalmente **CCR5** y/o **CXCR4** [16, 17]. La unión con el correceptor desencadena a su vez otros cambios conformacionales en la proteína transmembrana, la **gp41** [18, 19]. Este proceso permite la fusión de la envuelta viral con la membrana celular (**Figura 3**).

Una vez que se han fusionado las membranas, y la nucleocápside viral se encuentra en el citoplasma celular, se entra en el siguiente paso del ciclo replicativo, **la síntesis de ADN**. Este paso está mediado por la enzima retrotranscriptasa (**RT**), que es transportada en el propio virión. La retrotranscripción supone un complejo proceso que se realiza en el citoplasma de la célula diana [20]. El ADN proviral es transportado al núcleo celular en un proceso en el que participan las proteínas virales p17 y Vpr [21, 22]. Posteriormente el ADN proviral es integrado en el genoma celular mediante la integrasa viral (**IN**), aunque también se ha demostrado la presencia de ADN proviral no integrado que es susceptible de integración si la célula es activada. Una vez integrado, el VIH puede seguir un comportamiento variable: permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada [23, 24]. Después de haberse integrado, viene la etapa de **transcripción**, que supone la síntesis de ARN del virus a partir del ADN proviral integrado en la célula. Este ARN se sintetiza como un único transcrito que debe volver al citoplasma de la célula para procesarse en transcritos de diferente tamaño. Cuando el ARN viral está fuera del núcleo de la célula, se realiza el proceso de **traducción**, generando así nuevas proteínas víricas. Estas proteínas víricas participan en el **ensamblaje y brotación**: las proteínas del core, las enzimas y el ARN se ubican debajo de la membrana celular, mientras que las proteínas de envoltura viral se agregan a la membrana celular. Esto da origen a formas virales inmaduras (no infecciosas aún) que surgen de la superficie celular adquiriendo una envoltura que incluye proteínas virales y celulares. Las largas cadenas proteicas que conforman esta partícula viral inmadura son divididas en pequeñas estructuras

por una proteasa viral. De este paso resulta una partícula viral infecciosa y tiene lugar la liberación de la progenie viral [10, 25].

Figura 3. Ciclo replicativo del VIH [26].



1.1.1.3. Receptores virales: CD4 y receptores de quimioquinas.

La infección de la célula diana, el linfocito T-CD4+, se produce mediante la interacción con dos tipos de receptores [15, 27]:

- La molécula de CD4+ que es el receptor específico y común a todos los subtipos de VIH. Esta proteína está presente en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de estirpe mononuclearfagocítica, lo cual determina el tropismo viral por estos tipos celulares.
- Correceptores: Para conseguir la infección se requieren además otras moléculas denominadas inicialmente “factores de fusión” o correceptores que son los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4 [28].

Las quimioquinas o “citoquinas quimiotácticas” poseen propiedades quimioatrayentes y regulan el tráfico de leucocitos. Forman una familia de proteínas de bajo peso molecular, con alto grado de homología, cuya característica bioquímica común es la conservación de 4 residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro esenciales para la actividad de la molécula. Dependiendo de si las dos primeras cisteínas están o no separadas por otro

aminoácido, se han clasificado en quimioquinas CXC (Cis-X- Cis) y quimioquinas CC (Cis-Cis).

Las quimioquinas ejercen su actividad mediante la interacción con receptores presentes en la membrana de las células diana [29]. Como ocurre en el caso de las quimioquinas, los receptores también pueden agruparse en dos grandes familias, CCR y CXCR, que interaccionan con quimioquinas de la familia CC y CXC respectivamente. Sin embargo, una misma quimioquina puede unirse a diferentes receptores y un mismo receptor es capaz de activarse por la unión de diferentes quimioquinas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Receptores para las quimioquinas CXCL: ligandos y expresión celular.

Ligandos		Expresión celular
Receptores para CXCL		Neutrófilo: CXCR1, CXCR2
CXCR1	CXCL6 (GCP-2), CXCL7 (NAP-2), CXCL8 (IL-8)	Monocito: CXCR4
CXCR2	CXCL1 (GRO), CXCL2 (GRO), CXCL3 (GRO), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL7 (NAP-2), CXCL8 (IL-8)	Linfocito T en reposo: CXCR4 Linfocito T activado: CXCR3
CXCR3	CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)	Linfocito B: CXCR3, CXCR4
CXCR4	CXCL12 (SDF-1 /)	C. dendrítica: CXCR4
CXCR5	CXCL13 (BLC,BCA-1)	Célula NK: CXCR3
Receptores para CCL		
CCR1	CCL3 (MIP-1 , CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL14 (HCC-1), CCL15 (HCC-2), CCL23 (MPIF-1)	Linfocito T activado: CCR1,CCR2, CCR4, CCR5, CCR7
CCR2	CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4)	Linfocito B: CCR4, CCR5, CCR6, CCR7
CCR3	CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11 (Eotaxina-1), CCL13 (MCP-4), CCL15 (hcc-1), CCL24 (Eotaxina-2), CCL26 (Eotaxina-3)	Monocito: CCR1, CCR2, CCR5, CCR8
CCR4	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC)	C. dendrítica: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6
CCR5	CCL3 (MIP-1 , CCL4 (MIP-1 , CCL5 (RANTES)	Célula NK: CCR2, CCR5 Eosinófilo: CCR1, CCR3 Basófilo: CCR2, CCR3
CCR6	CCL20 (MIP-3 (LARC)	
CCR7	CCL19 (MIP-3 , CCL21 (6Ckine, SLC)	
CCR8	CCL1 (I-309), CCL4 (MIP-1 , CCL17 (TARC)	
CCR9	CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL25 (TECK)	
CCR10	CCL27 (CTACK, ILC), CCL28 (MEC)	
CCR11	CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11(Eotaxina-	

1), CCL13 (MCP-4)		
Receptores para XCL		
XCR1	XCL1 (Linfotactina, ATAC)	
Receptores para CX3CL		
CX3CR1	CX3CL1 (Fractalquina)	Linfocito T activado, linfocitos B, monocitos v células NK

En estudios in vitro se ha observado que muchos receptores de quimioquinas son capaces de actuar como correceptores del VIH, pero in vivo son fundamentalmente dos, CCR5 y CXCR4. El primero tiene como ligandos las CC-quimioquinas MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos tipo 1 alpha), MIP-1 β (proteína inflamatoria de macrófagos tipo 1 beta) y RANTES (en inglés *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*) [30]; y es el receptor principal de las cepas R5, antes denominadas no sincitiales. El receptor CXCR4 tiene como único ligando la quimioquina SDF-1 (factor derivado de células del estroma tipo 1) [31], denominada actualmente CXCL12, y es el principal receptor de las cepas X4, antes denominadas sincitiales.

Tras la interacción con el receptor CD4, la gp-120 de la envoltura viral experimenta un cambio conformacional que le permite unirse a los correceptores virales CCR5 y/o CXCR4 [32]. Además de los linfocitos T CD4+, existen otras poblaciones celulares dentro del sistema inmunitario que expresan el receptor CD4 y los principales correceptores del VIH-1 (CXCR4 y CCR5), como las células dendríticas de sangre periférica (SP) [33-36], lo que en principio las hace susceptibles a la infección por el VIH [34, 37, 38]. Es más, debido a su amplia localización en superficies mucosas, las células dendríticas son consideradas por algunos autores como la primera célula diana del VIH en las fases más tempranas de la infección [39, 40], de acuerdo con los resultados de diferentes estudios realizados tanto in vivo como ex vivo [34, 37, 41, 42].

La conformación de distintas regiones de la proteína gp120, especialmente del bucle V3, condiciona el tropismo de los distintos aislados virales [43-45]. Además de los virus con un tropismo estricto por CCR5 o por CXCR4, se han descrito variantes virales capaces de entrar en la célula a través de los dos correceptores mayores (cepas de tropismo dual o ampliado, denominadas R5X4) y aislados capaces de unirse a otros correceptores como CCR2 o CCR3.

Las quimioquinas que se unen a CCR5 y CXCR4, especialmente RANTES, MIP-1 α/β y SDF, son capaces de inhibir la infección por el VIH debido a un fenómeno de competición en la unión con sus correceptores y por la internalización de los receptores de quimioquinas tras la interacción con su ligando. Así mismo, la caracterización de los correceptores del VIH y sus ligandos naturales ha permitido definir una serie de variantes genéticas que se asocian con resistencia a la infección o con una progresión lenta de la enfermedad.

1.1.2. Variabilidad genética del VIH: tipos y subtipos.

Dos formas del VIH genéticamente diferentes pero antigénicamente relacionadas, denominadas VIH-1 y VIH-2, se han aislado de pacientes con SIDA. El VIH-1 es el tipo más común asociado con el SIDA en Estados Unidos, Europa y África Central, mientras que el VIH-2 causa una enfermedad similar, principalmente, en África Occidental [25, 46]. Dentro del VIH-1, según su homología genética, se diferencian 3 grupos; M (main ó principal, >98%), O (Outlier ó atípico <1%) y N (no M, no O, <1%). Recientemente se ha descrito un posible nuevo grupo al que se propone llamar grupo P [47].

El grupo M ha sido dividido en varios subtipos (A-D, F-H, J, K) y al menos 29 formas recombinantes circulantes [48, 49]. Los grupos O y N presentan baja prevalencia, y se encuentran principalmente en África subsahariana occidental [50, 51], e incluso se encuentran virus recombinantes entre subtipos denominados CRF (formas recombinantes circulantes). El subtipo B sigue siendo el más predominante en Europa y América del Norte pero los subtipos no-B dan cuenta del 95% de las infecciones en el mundo [52]. Aún así, con la gran movilidad de la población, los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo.

1.1.3. Transmisión de la infección.

El VIH infecta exclusivamente al hombre, siendo éste el único reservorio conocido en la naturaleza. Por ello, la transmisión del VIH se produce siempre desde una persona infectada a otra susceptible. Las vías de transmisión de la infección VIH han sido bien identificadas e incluyen por vía parenteral (transfusiones y usuarios de drogas por esta vía), contagio por vía sexual, y la transmisión madre-hijo.

1.1.3.1. Transmisión por vía parenteral.

En los países desarrollados, el uso de drogas intravenosas es el factor de riesgo más importante para la adquisición de las infecciones víricas por el virus de la inmunodeficiencia humana [5] y el virus de la hepatitis C (VHC).

Los mecanismos involucrados a esta vía son: drogadicción parenteral, transfusión de sangre y hemoderivados, y en trasplante de órganos y tejidos [53-55]. Los usuarios de drogas intravenosas (UDVP) pueden presentar otras prácticas de riesgo adicionales (prácticas sexuales, tatuajes, etc.), por lo que la posibilidad de infección por VIH en este colectivo puede ser mayor [56].

1.1.3.2. Transmisión por vía sexual.

El medio más común de transmisión del VIH siguen siendo las relaciones sexuales sin protección con una persona infectada [57].

1.1.3.3. Transmisión por vía vertical.

La vía de transmisión vertical constituye en la actualidad el principal mecanismo de infección del VIH en niños y puede ocurrir durante el embarazo, el parto o la lactancia [58].

1.1.4. Epidemiología de la infección VIH.

La OMS/ONUSIDA, en su balance sobre la situación de la epidemia del SIDA en Diciembre de 2009, estimó que el incremento constante en la población de personas que vive con el VIH refleja los efectos combinados de las tasas persistentemente altas de nuevas infecciones por el VIH y la influencia beneficiosa del tratamiento antirretrovírico. Hasta diciembre de 2009 aproximadamente 5 millones de personas en países de ingresos medios y bajos recibían tratamiento; un aumento diez veces mayor en cinco años. En 2009, la cifra estimada de nuevas infecciones por el VIH fue de 2,6 millones [2,3 millones–2,8 millones] [59].

En la **tabla 3** se observa que el número total de personas que viven con el VIH ha ido aumentando de manera uniforme debido a las nuevas infecciones que ocurren cada año, a los tratamientos que prolongan la vida y a que las nuevas infecciones que aún superan en número a los fallecimientos provocados por el SIDA.

En España, el Registro Nacional de Casos de SIDA ofrece información sobre la evolución de esta enfermedad en este territorio. La incidencia de SIDA es un indicador de la frecuencia y evolución de los estadios avanzados de la infección por VIH en la población, siendo clave para evaluar la efectividad de los tratamientos y las intervenciones que tienen mayor impacto en la evolución del SIDA tanto en el ámbito individual como comunitario. (**Figura 4 y 5**).

Tabla 3. Resumen mundial de la epidemia de sida. 2009. [59]

Personas que vivían con VIH en el 2009	Total	33,3 millones (31,4 -35,3 millones)
	Adultos	30,8 millones (29,2-32,6 millones)
	Mujeres	15,9 millones (14,8-17,2 millones)
	Menores de 15 años	2,5 millones (1,6-3,4 millones)
Nuevas Infecciones por el VIH en el 2009	Total	2,6 millones (2,3 -2,8 millones)
	Adultos	2,2 millones (2,0-2,4 millones)
	Menores de 15 años	370000 millones (230000-510000 millones)
Defunciones causadas por el SIDA en el 2009	Total	1,8 millones (1,6 -2,1 millones)
	Adultos	1,6 millones (1,4-1,8 millones)
	Menores de 15 años	260000 millones (150000-360000 millones)

Figura.4 Incidencia anual de sida en España corregida por retraso en la notificación Registro Nacional de Sida. Actualización a 30 de junio de 2010. [60]

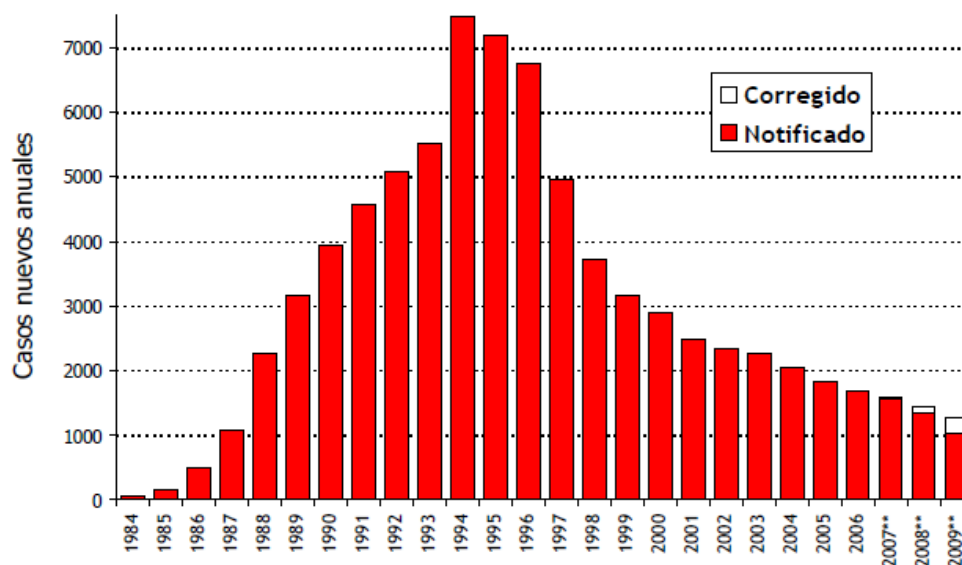
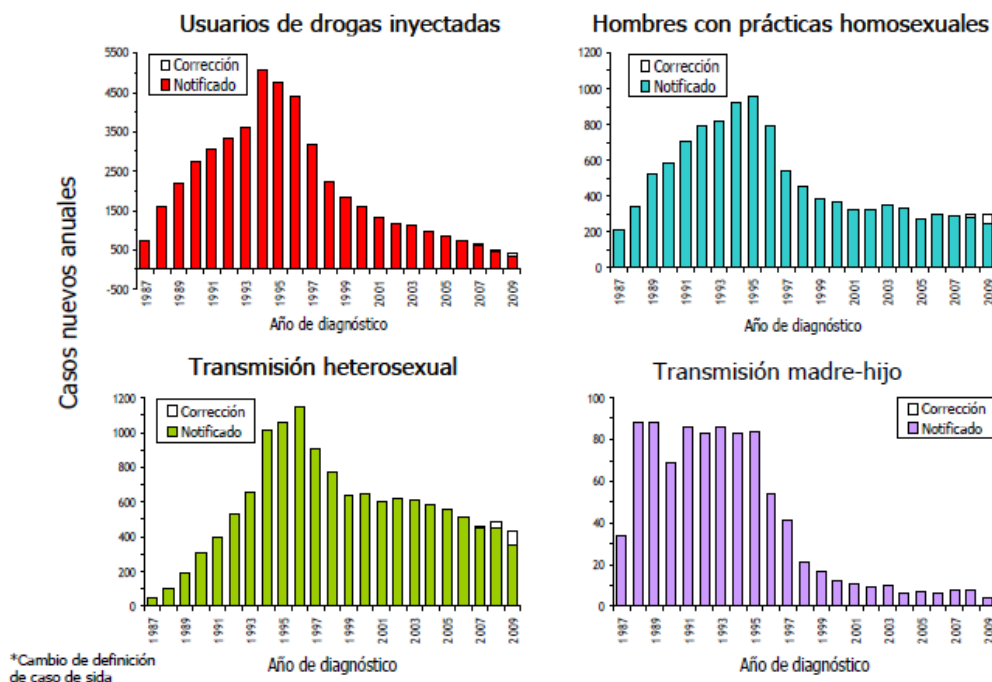


Figura.5 Casos de sida en España corregidos por retraso en la notificación. Registro Nacional de Sida. Actualización a 30 de junio de 2010 [60]



1.1.5. Historia natural de la infección por el VIH-1.

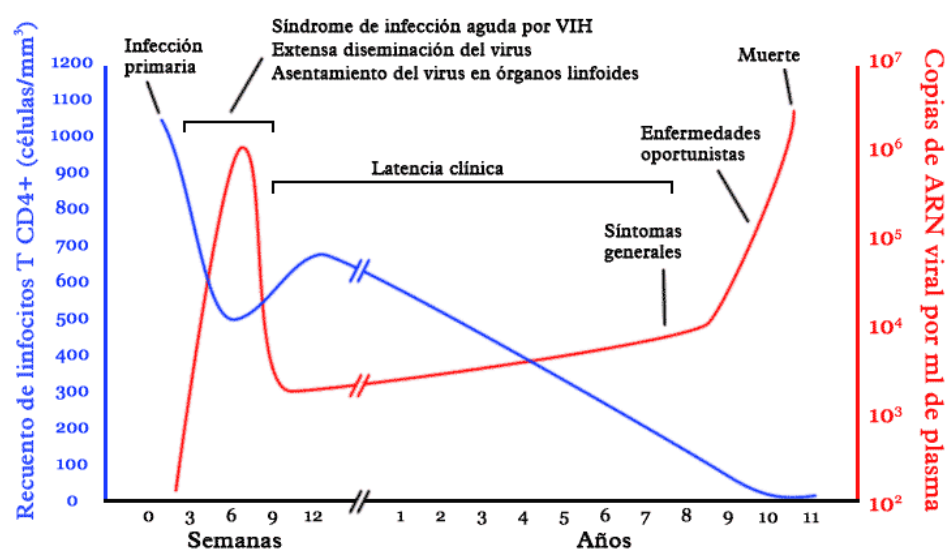
Después de la entrada del VIH en el organismo, se inicia un proceso en el que se distinguen una serie de fases o estadios evolutivos bien definidos, con una duración variable, que depende de una serie de factores tanto del virus como del huésped.

Las distintas fases en que se divide la historia natural de la infección son: 1) Fase aguda o primoinfección, que comprende desde el momento del contagio hasta que se produce la seroconversión. 2) Fase crónica o asintomática, que tiene una duración muy variable, en la que existe un equilibrio dinámico entre la replicación viral y la respuesta inmunológica del paciente. 3) Fase final, a partir del diagnóstico de SIDA, a la que se llega como consecuencia de la ruptura de este equilibrio, aumentando la carga viral (CV) y con un progresivo deterioro de la función inmunitaria. Finalmente, en ausencia de tratamiento, se produce la muerte del paciente debido a los tumores o infecciones oportunistas. Dentro de la infección primaria, hay un periodo de aproximadamente 10 días conocido como fase de eclipse después del cual el VIH empieza a ser detectable en plasma. Además, en esta fase aparece un síndrome similar a una mononucleosis con una duración aproximada de 3 a 6 semanas [61]. En las primeras 2-8 semanas de infección se produce una caída significativa de linfocitos T-CD4⁺ en sangre periférica [62] (**Figura 6**).

Al pasar a la fase crónica, los valores de linfocitos T-CD4⁺ pueden recuperarse de nuevo, pero no a los valores basales de antes de la infección primaria. Después de la tercera semana de infección se observa un máximo en la viremia del VIH, observándose una replicación masiva del virus y detectándose fácilmente virus infectivos y proteínas virales en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo. La cantidad de viriones en sangre periférica varía entre 10^6 y 10^7 por mililitro [61, 63].

Se detectan respuestas inmunes específicas frente al VIH entre las semanas 3 y 6 posteriores a la infección y se asocian a la caída de la viremia y de los valores de antígenos virales en plasma [64]. La caída de viremia en la infección primaria se ha asociado también a la aparición de células T citotóxicas (CTL) específicas frente al VIH [65]. Las terapias antirretrovirales administradas durante esta fase de infección primaria han mostrado su eficacia por incrementar los valores de linfocitos T-CD4⁺ y mejorar el curso clínico de la enfermedad en comparación con los individuos infectados por el VIH que no fueron tratados durante la infección primaria [66].

Fig. 6 .Historia natural de la infección por el VIH-1.



El virus que se transmite en la infección aguda, por lo general, corresponde al que presenta tropismo por los macrófagos, y que requiere de la presencia del correceptor CCR5 (cepas R5) y se caracterizan por no producir sincitios linfocitarios cuando se cultivan in vitro. Por el contrario, las cepas que aparecen en estadios avanzados de la infección –cepas X4– requieren de la expresión del correceptor CXCR4, siendo cepas linfotrópicas y formadoras de sincitio [67].

Con el tiempo, los mecanismos de inmunosupresión y destrucción de los linfocitos T-CD4⁺ por el VIH junto con la aparición de variantes más agresivas del virus, romperán este equilibrio y el sistema inmunitario presentará una incapacidad progresiva para controlar la replicación que conducirá a la aparición de las enfermedades oportunistas de la fase final del SIDA. La CV con la que se llega al equilibrio dinámico (steady-state), será uno de los principales factores determinantes del tiempo de evolución a SIDA [68].

Durante este periodo de infección crónica se pueden detectar altos niveles de ARN del VIH en todo el ganglio linfático, especialmente en las regiones perifoliculares de los centros germinales. Hasta un tercio de los linfocitos T-CD4⁺ en tejido linfóide y sangre periférica tienen ADN del VIH detectable, la mayor parte del cual es genoma defectivo [68]. El SIDA es el estadio clínico más avanzado de la enfermedad, representando la etapa final de la infección por el VIH [24, 69-73]. Esta fase se caracteriza por la progresiva disminución (depleción) de la población de linfocitos T-CD4⁺, los cuales representan la principal diana del virus.

1.1.6. Respuesta inmune frente al VIH.

1.1.6.1. Respuesta humoral.

La infección por el VIH induce una intensa respuesta de anticuerpos frente a prácticamente todas las proteínas reguladoras y estructurales del virus. Se ha descrito síntesis de anticuerpos no sólo frente a la envoltura, sino también frente a las proteínas de la matriz, de la nucleocápside viral y proteínas reguladoras del virus. Algunos de estos anticuerpos tienen capacidad neutralizante “in vitro” y en experimentos de inmunoterapia “in vivo” [74]. Sin embargo, la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante es escasa y rápidamente se observa un escape viral a los mismos [26].

En relación a la respuesta humoral inespecífica existen numerosos factores solubles que son activos frente a la infección por el VIH. Los virus en general, y el VIH en concreto, son sensibles a la inhibición por complemento [26]. También pueden intervenir las defensinas, moléculas efectoras de la inmunidad innata producidas fundamentalmente por leucocitos y células epiteliales, que poseen un amplio rango de acción frente a gran diversidad de microorganismos [75-77]. Probablemente estos mecanismos representan una barrera parcial frente a la infección, pero son insuficientes para controlar la replicación viral completa.

1.1.6.2. Respuesta celular.

En la infección VIH se produce una respuesta celular antiviral en distintas poblaciones linfocitarias como linfocitos T-CD4+, CTL y células de estirpe NK [26]. Sin embargo, la mayoría de los trabajos coinciden en que la respuesta CD4+ y CD8+ constituye el mecanismo más importante de protección frente al VIH. El estudio de la respuesta citotóxica “in vitro” ha demostrado que en los pacientes seropositivos existe una expansión clonal de CTL [78]. Esta respuesta es especialmente marcada durante la primoinfección y su intensidad se correlaciona con el control de la replicación viral [79].

1.1.6.3. Respuesta inmunitaria en pacientes no progresores.

Existe un pequeño porcentaje de pacientes infectados que sin tratamiento antirretroviral permanecen asintomáticos y mantienen cifras de linfocitos CD4+ superiores a 500/μl, así como cargas virales muy bajas durante más de 15-20 años tras haber sido infectados. En estos pacientes, denominados progresores lentos (LTNP, Long Term Non progressors), los mecanismos efectores frente al VIH presentan una actividad muy superior a la observada en pacientes que evolucionan rápidamente a SIDA [80].

1.1.6.4. Mecanismo de escape viral.

1.1.6.4.1. Variabilidad genética.

La variabilidad genética del VIH es alta y es debida a la elevada tasa de error de la RT inversa, lo que supone la producción de una gran proporción de virus defectivos y la generación de una alta diversidad en las proteínas del virus que le permiten escapar al control de la respuesta inmune específica [81]. A esta variabilidad debida a la tasa de error de la transcriptasa inversa se añaden otros mecanismos como la recombinación genética que origina nuevos subtipos.

1.1.6.4.2. Latencia y reactivación.

El VIH es capaz de infectar de forma latente sus células diana, lo que le permite escapar de forma absoluta a la vigilancia inmunológica al no expresar productos virales en su membrana [82]. Adicionalmente, los procesos de reactivación y reinfección se producen en los centros germinales de los órganos linfoides, que presentan un microambiente idóneo para el proceso de infección. Por otra parte, la reactivación a partir del estado de latencia es un proceso tan

rápido que puede dificultar una respuesta citotóxica eficaz que destruya los linfocitos en los que el virus se está reactivando [83].

1.1.6.4.3. Escape a los mecanismos de restricción celular de la infección.

Dentro de los mecanismos de restricción celular, unos son generales y afectan a diversos virus, pero otros son específicos y, en el caso de los retrovirus, existe una especificidad de especie que restringe la replicación de un retrovirus en otras especies. Algunos de estos mecanismos han sido caracterizados en el ser humano y corresponden a las proteínas TRIM5 α [82, 84] y APOBEC3G [85]. El VIH ha modificado determinados residuos de su cápside de manera que le permiten eludir el bloqueo por TRIM5 α humano. Así mismo, la proteína APOBEC3G favorece la formación de retrotranscritos con alta tasa de error (y por tanto abortivos), bloqueando de esta manera la infección. El VIH, mediante la proteína Vif, bloquea la acción de la APOBEC y puede escapar del control del sistema inmune innato [85, 86].

1.1.7. Terapias antirretrovirales contra el VIH.

Al instaurar la TAR, se buscó como objetivo suprimir completamente la CV del VIH para evitar la aparición de cepas mutantes resistentes [87]. Los progresos en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad por el VIH combinado con el desarrollo de agentes antirretrovirales (ARV) potentes, han incrementado el número de opciones de tratamientos. Por otra parte, el conocimiento de la capacidad del VIH de producir viriones nuevos continuamente en el tejido linfóide a lo largo del curso de infección, incluso durante la fase clínicamente latente [88], y la alta tasa de replicación han favorecido la aparición de resistencias [89, 90] .

1.1.7.1. Ciclo viral y agentes antirretrovirales.

Existen seis grandes grupos de ARV que comprenden 29 productos comerciales aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) de Estados Unidos de América para el tratamiento de la infección por VIH (**Tabla 4**).

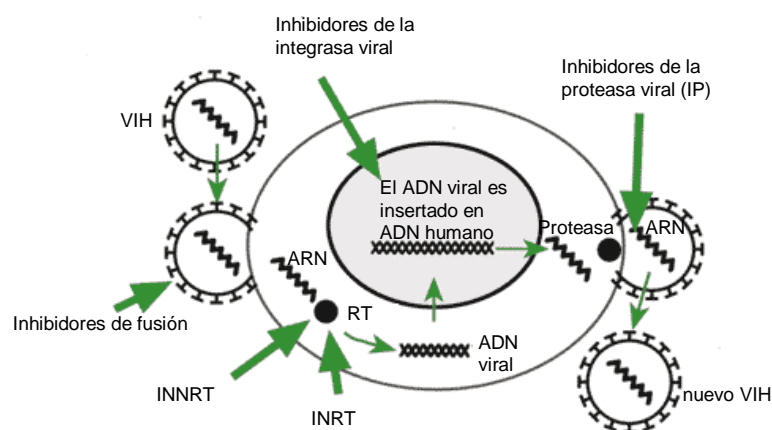
Tabla 4. Tipos de terapias antirretrovirales según su modo de acción aprobados por la FDA de Estados Unidos de América para el tratamiento de la infección por VIH .

Inhibidores de RT			Inhibidores de proteasa	Inhibidores de fusión	Inhibidores de integrasa
INRT	INNRT	INtRT	IP	IF	II
Zidovudina (Retrovir, ZDV, AZT)	Nevirapina (Viramune, NVP),	Tenofovir (TNF, Viread)	Saquinavir (Invirase, SQV)	Enfuvirtida (Fuzeon o T-20;ENF)	Raltegravir (Isentress, RGV, RAL)
Didanosina (ddl, Videx, Videx EC)	Delavirdina (Rescriptor, DLV),	Adefovir (PMPA, Preveon Hepsera)	Indinavir (Crixivan, IDV)	Maraviroc (Selzentry o Celsentri, MRV)	
Estavudina (Zerit, d4T)	Efavirenz (Sustiva o Stocrin, EFV)		Ritonavir (Norvir, RTV)		
Lamivudina (EpiVir, 3TC)	Etravirina (Intelence, ETV).		Nelfinavir (Viracept, NFV)		
Abacavir (Ziagen, ABC)	Rilpivirina (Edurant, RPV)		Amprenavir (Agenerase, APV)		
Tenofovir (Viread, TDF)			Lopinavir/ritonavir (Kaletra, LPV/RTV)		
Zalcitavina (ddC). Hivid			Atazanavir (Reyataz, ATZ)		
Emtricitabina (FTC, Emtriva)			Fosamprenavir (Lexiva o Telzir, FPV, fAPV)		
Entecavir (INN, Baraclude)			Tipranavir (Aptivus, TPV)		
Apricitabina (ATC). aprobada 2011.			Darunavir (Prezista, DRV)		

Abreviaturas: RT: retrotranscriptasa; INRT: inhibidores análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa; INNTR: inhibidores no análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa; INtRT: inhibidores análogos de nucleótidos de la retrotranscriptasa; IP: inhibidores de proteasa; IF: inhibidores de fusión; II: inhibidores de integrasa.

a) Inhibidores de la RT viral (Figura 7). La mayoría de los inhibidores de la RT son análogos de nucleósidos (INRT) que actúan como terminadores de cadena durante la síntesis del ADN viral en virtud de su estructura (falta 3'-OH necesario para alargamiento de la cadena de ADN). Un segundo grupo son los inhibidores análogos de nucleótidos de la retrotranscriptasa (INtRT). El modo de acción del INRT e INtRT es esencialmente el mismo, son análogos de los deoxinucleótidos necesarios para sintetizar el ADN viral y que compiten con los deoxinucleótidos naturales para su inclusión en la cadena de ADN viral en crecimiento. Existe un tercer tipo de inhibidores de RT son los no análogos de nucleósidos (INNRT). Son agentes que se unen de manera no competitiva a la RT, y producen inhibición alostérica de la enzima al unirse en sitios diferentes del sitio de unión de los nucleósidos. A diferencia del grupo anterior, no poseen metabolismo intracelular, es decir, que no necesitan fosforilarse para ser activos. Son activos contra cepas de VIH-1 pero no tienen efecto contra el VIH-2, ni inhiben a la ADN polimerasa celular. Las desventajas de los inhibidores de la RT son los efectos secundarios tales como múltiples trastornos neurológicos y hematológicos, la rapidez con la que aparecen variantes virales resistentes (cuasiespecies), la aparición de resistencias cruzadas y la falta de efecto en las células ya infectadas por el VIH que no necesitan el paso de la RT para completar el ciclo biológico del virus [91].

Figura 7 .Sitios de acción de los distintos antirretrovirales. (Adaptado de www.pharmj.com).



b) Inhibidores de la proteasa viral (IP). Su mecanismo de acción está basado en el bloqueo de la acción de la proteasa del VIH (**Figura 7**). Se unen a la poliproteína precursora de Gag entre las posiciones de los péptidos p24 y p17, componentes del virión y necesarias para la capacidad de infección del virus [92]. Los IPs se han convertido rápidamente en drogas de elección para el tratamiento de la infección por el VIH en combinación con inhibidores de la RT [93], produciendo una actividad antiviral potente. Los IPs fueron introducidos en 1996, lo que supuso un punto de

inflexión en la historia natural de la enfermedad [94]. La llamativa reducción en la morbi-mortalidad asociada a la infección VIH desde esa fecha está en relación con la utilización generalizada de combinaciones de al menos, 3 fármacos con acción sinérgica frente al VIH en pautas conocidas como terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).

c) Inhibidores de la fusión viral que impiden la entrada del virus en la célula. Dos medicamentos de este tipo han sido ya aprobados por la FDA: Enfuvirtida (Fuzeon o T-20) y Maraviroc (Selzentry o Celsentri, MVC). El mecanismo del primero de ellos se basa en que su secuencia es similar a la del dominio HR2 de la gp41 e interacciona en su lugar con el dominio HR1, impidiendo así el acercamiento de las membranas celular y viral previo a la fusión [95]. El MVC bloquea la entrada del virus en la célula a través del bloqueo de los correceptores CCR5 o CXCR4 [17].

d) Inhibidor de la integrasa viral que previene la integración del ADN viral (provirus) en el ADN de la célula hospedadora. El primer ART de este tipo es Raltegravir (Isentress, RGV, RAL).

1.1.7.2. Terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).

La TARGA consiste en combinaciones de 3 fármacos de, al menos, 2 familias diferentes. Las combinaciones más recomendadas son [96]: a) 2 INRT y 1 INNRT (primera opción), b) 2 INRT y 1 IP (segunda opción). Los diferentes abordajes terapéuticos existentes se basan en los parámetros clínicos y de laboratorio (CD4⁺ y CV). Sin embargo, aún no existen criterios ideales para el inicio de la TAR. El mejor momento para iniciar la TAR es cuando el sistema inmune aún no ha sufrido un daño irreversible y tampoco han aparecido cepas virales resistentes.

Actualmente no es posible erradicar el VIH-1 con los tratamientos antirretrovirales existentes [97]. Esto se debe fundamentalmente al establecimiento temprano, durante la infección aguda, por el VIH-1 de un reservorio de linfocitos T-CD4⁺ latentes infectados que poseen una vida larga y persisten aún con supresión prolongada de la viremia plasmática. De manera que los objetivos que deben perseguirse al iniciar la TARGA son los siguientes:

1. Viroológicos: supresión de la CV con valores indetectables en sangre (<50 copias/mL).
2. Inmunológicos: restaurar y/o preservar la función inmune de linfocitos T-CD4⁺.
3. Clínicos: reducir la morbilidad y mortalidad, mejorar la calidad de vida, y lograr la reincorporación del sujeto al entorno laboral, social y familiar.

4. Epidemiológicos: prevenir la transmisión de la infección por VIH a personas que no están infectadas por el virus
5. Económicos: Reducir el costo de atención de las infecciones oportunistas, los gastos de hospitalización y el cuidado de los pacientes.

1.1.7.3. Resistencias al tratamiento antirretroviral.

La resistencia se define como el aumento en la capacidad de replicación viral en presencia de los ARV. La resistencia a ARV tiene un origen genotípico y una traducción fenotípica. La resistencia genotípica se refiere a las mutaciones en la secuencia del gen diana de las proteínas virales (RT o proteasa) que se asocian a mayor capacidad de replicación viral.

Los fármacos antirretrovirales pierden la eficacia esperada al desarrollarse un gran número de resistencias [98]. Éstas constituyen una de las principales causas del fracaso terapéutico, limitando las opciones futuras y complicando significativamente el manejo de los pacientes [99]. La probabilidad de aparición de mutantes virales resistentes se basa en cuatro grandes factores: 1) la variabilidad genética del VIH gracias a la alta frecuencia de mutaciones y a los fenómenos de recombinación, 2) la gran capacidad de replicación viral con una producción diaria de 10^{9-10} viriones al día, 3) la capacidad intrínseca de mutación de la diana viral, y 4) la presión farmacológica selectiva [100].

1.1.7.4. Terapia de rescate.

El fracaso terapéutico puede ser definido desde 3 puntos de vista: clínico, inmunológico y virológico.

- 1) El fracaso virológico: a) CV detectable a las 24 semanas de iniciada la TAR, o b) tras alcanzar una CV indetectable (<50 copias/ml) y ésta vuelva a ser detectable en dos determinaciones consecutivas.
- 2) El fracaso inmunológico: en general se admite, basándose en los estudios de cinética celular, que durante el primer año debería existir un aumento como mínimo de 50-100 linfocitos T-CD4⁺.
- 3) El fracaso clínico: la aparición de episodios clínicos B o C asociados a progresión de la infección VIH. No siempre se asocia a fracaso virológico.

Si tras evidenciar un fracaso terapéutico, se decide cambiar el régimen del tratamiento, se han de considerar siempre las posibilidades existentes y futuras, el cumplimiento por parte del

paciente y la posibilidad de desarrollar efectos secundarios. Se ha de intentar sustituir el mayor número de fármacos posible y se aconseja disponer de una prueba de resistencias genotípica para guiar el nuevo régimen [101]. Si la causa del fallo radica en una mala adherencia, en ausencia de resistencias demostrables, podría prescribirse el mismo régimen siempre y cuando se solventen las causas del mal cumplimiento, pudiendo optar por una pauta de más fácil cumplimiento y mejor tolerada [102].

La actitud ante un caso con múltiples fracasos debe ser individualizada pues siempre se trata de situaciones complejas. En estos casos, se ha de intentar evitar la sustitución de un solo fármaco, al menos se debe intentar añadir 2 nuevos fármacos a la combinación para lo cual en ocasiones se ha de esperar a que nuevos agentes estén disponibles para su uso, siempre y cuando no exista un descenso de la cifra de linfocitos T-CD4⁺ hasta un nivel de riesgo [103]. Cuando la pauta que falla consiste en 2 INTR y 1 INNRT se puede intentar sustituir por 2 INRT nuevos y un IP potenciado [104]. Si el régimen previo incluye ya 2 INRT y un IP, se puede intentar cambiar a 2 INRT nuevos y 1 INNRT o a regímenes que incluyan las 3 familias de fármacos [105]. En el caso, no infrecuente, de que los pacientes presenten fracasos a pautas que incluyan las 3 familias se debe intentar sustituirlos por 2 ó 3 nuevos INRT y al menos 1 IP potenciado [106].

1.2. Virus de la Hepatitis C (VHC)

1.2.1. Características generales del VHC

El VHC es el agente etiológico de la hepatitis C crónica que afecta a más de 200 millones de personas en todo el mundo [107]. La estructura molecular del virus fue identificada en el año 1989 por Michael Houghton y sus colaboradores de la compañía Chiron Corporation (Emerville, California) tras llevar a cabo el clonado de las regiones del genoma del VHC y el desarrollo de un test para el diagnóstico de los anticuerpos [108, 109].

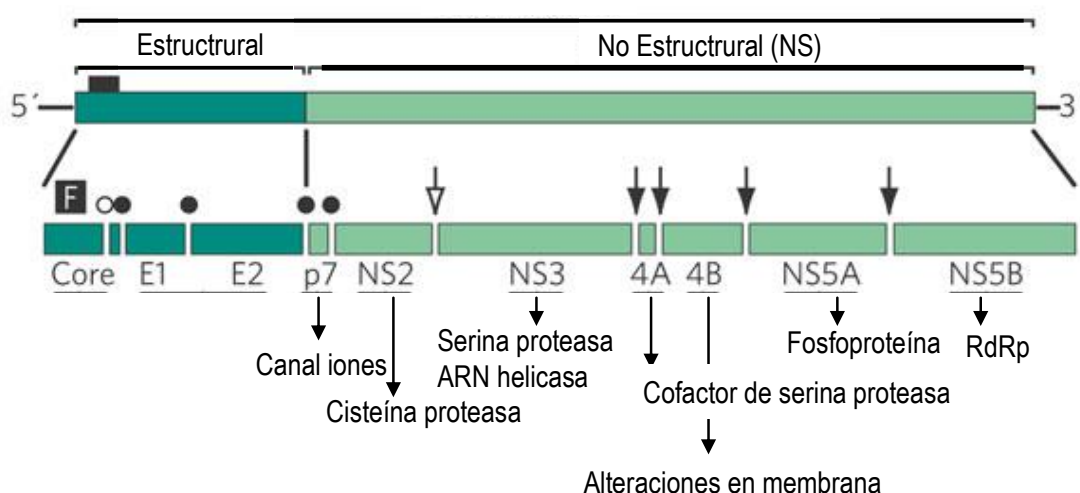
1.2.2. Estructura y genoma del VHC.

El VHC es un virus con envuelta glicolipídica. Su genoma es una molécula de ARN monocatenario, lineal, de "sentido positivo", de unos 9.600 nucleótidos, semejante en organización al de los Flavivirus y Pestivirus. Es el único miembro del género Hepacivirus en la familia Flaviviridae.

El genoma del VHC contiene un solo marco de lectura abierto (*open Reading frame*, ORF) de aproximadamente 10 Kb [110], que codifica una poliproteína vírica de aproximadamente 3000

aminoácidos, la cual es desdoblada después de la traducción para generar 10 proteínas víricas [111]. Contiene tres proteínas estructurales (core, E1, E2) y siete proteínas no estructurales o NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). Dos regiones no codificantes, ubicadas en ambos extremos del genoma (5'UTR y 3'UTR) son requeridas para la transcripción y replicación del genoma. (**Figura 8**). Este proceso también requiere un elemento de replicación en *cis* situado en la secuencia codificante del gen NS5B [112].

Figura.8 Organización genómica del Virus de la Hepatitis C.



La traducción a partir del ORF es dependiente de un sitio interno de iniciación (IRES) en la región 5' UTR, que interactúa directamente con la subunidad 40S ribosomal durante la iniciación de la traducción [113]. La poliproteína viral es fragmentada, co- y pos-traduccionalmente, por proteasas pertenecientes tanto al hospedador como al virus, generando proteínas estructurales y proteínas NS. El primer corte lo realiza una proteasa del hospedador dando lugar a la única proteína de la cápside, la proteína core, a las proteínas de la envuelta E1 y E2, y a una pequeña proteína de membrana (p7) que ha sido clasificada como una viroporina por ser capaz de formar poros en las membranas promoviendo la infectividad del virus [114]. Las proteínas NS restantes son procesadas por proteasas virales.

Los primeros 191 aminoácidos del extremo N-terminal de la región estructural codifican las proteínas de la cápside. Estas proteínas tienen capacidad de unirse al ARN viral, son inmunógenas y presentan una secuencia de aminoácidos altamente conservados entre los diferentes aislados víricos. Entre las regiones E1 y E2 (gp31 y gp70) de la envuelta se encuentra la zona denominada HVR1 (hipervariable 1) que permite al virus su escape del sistema inmunitario y, por lo tanto, su capacidad de influencia en la aparición de infecciones persistentes

y de fracasos terapéuticos [115]. E1 y E2 se relacionan físicamente entre sí para desempeñar un papel importante en la fijación del virus y su entrada en las células diana [116].

La segunda región, no estructural, codifica 6 proteínas enzimáticas (NS2 a NS5) con acción proteasa, helicasa y ARN-polimerasa dependiente de ARN (**Figura 8**). Dentro de esa región es importante reseñar el papel de NS3 y, sobre todo de NS5, por presentar el sitio de unión a la PKR (protein-quinasa) y la zona ISDR (región determinante de la sensibilidad al interferón), ambas implicadas en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento con interferón [117]. Es importante la enorme variabilidad en la secuencia de aminoácidos de regiones HVR de E2 o NS5A. Esta variabilidad puede generarse a través de mecanismos de selección específicos que operan en el virus y que están asociados con escape del sistema inmune. Por ejemplo, la región HVR en E2 puede ser blanco de anticuerpos neutralizantes y la persistencia entonces requiere variaciones continuas de la secuencia viral para evadir la respuesta de células B [118].

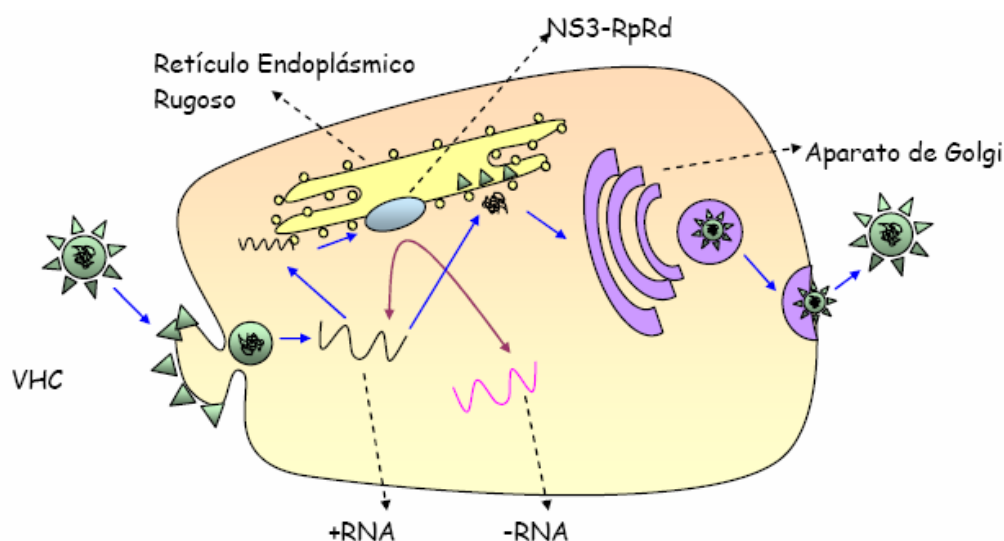
1.2.3. Ciclo de infección del VHC.

Usando aislados clínicos y partículas derivadas de cultivos celulares se han identificados una serie de receptores que pueden estar involucrados en la unión del virión a la superficie celular para facilitar su entrada [119-121]. Entre ellos, destacan las tetraspaninas CD81 y CD151, el receptor scavenger (o receptor “barredor”) tipo I clase B (SR-BI), el receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) y también la lecitina tipo L-SIGN, DC-SIGN, el receptor de Asialoglicoproteínas (ASGPR), el heparan sulfato y la Claudina-1.

La internalización del VHC con la célula ocurre por medio de la unión a un receptor celular y endocitosis, siguiendo un mecanismo pH-dependiente. Esto indica que la entrada se produce pasando por vesícula que maduraran a endosomas, donde se producirá la fusión de la envuelta viral con la membrana endosomal, liberando el genoma viral al citoplasma, en donde se traducirá y replicará, cerrando así su ciclo vital [122-125]. (**Figura 9**).

El ensamblaje se piensa que debe comenzar con la interacción de la proteína core con el ARN viral. Esta unión parece que, de alguna forma, es un mecanismo que funcionaría como un interruptor: apagando el proceso de traducción/replicación y encendido en el de ensamblaje [126]. La nucleocápside adquiere la envuelta mediante gemación al salir del retículo endoplásmico. Finalmente, el virión es liberado mediante la ruta de secreción mediada por el aparato de Golgi.

Figura 9. Modelo del ciclo infeccioso del VHC. (Adaptado de [127]).



1.2.4. Heterogeneidad genética del VHC.

Una de las características más importantes de la infección por el VHC es la gran variabilidad genética [128], es decir, el alto grado de heterogeneidad en secuencias genómicas y, por tanto, de las proteínas codificadas. Esta variabilidad da lugar a una población de genomas con variantes del ARN conocida como cuasiespecies (población de variantes genómicas que difieren de la secuencia original de nucleótidos entre un 1% y un 5%), que se clasifica según sea variabilidad intragenómica que da lugar a las cuasiespecies víricas, o intergenómica, que da lugar a los genotipos y subtipos [129]. La cuasiespecie predominante sería aquella que contara con mayor capacidad replicativa en el huésped. Estas características tienen implicaciones en la patogenia y persistencia del virus, diseño de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, diseño e interpretación de los métodos diagnósticos, etc.

La rapidez de la replicación viral y la incapacidad de la ARN polimerasa para corregir errores introducidos en el genoma del VHC favorecen la aparición frecuente de mutantes genómicos. Durante la infección, el número y la composición de mutantes en la población viral cambian constantemente en relación con los cambios de su entorno, lo que constituye una gran ventaja adaptativa para el virus. Cuando el conjunto replicativo está bien adaptado a su entorno, las mutaciones nuevas tienden a ser deletéreas y a disminuir la capacidad general de replicación de los genomas que lo portan. Cuando, por el contrario, el conjunto replicativo no está bien adaptado, las nuevas mutaciones pueden ser ocasionalmente ventajosas, empujando a la selección a una nueva distribución en el espacio de secuencias virales [130, 131].

Sin embargo, la variabilidad genética no parece ser igual en todas las áreas del genoma, hay unas partes del genoma que están bien conservadas, mientras que otras muestran distintos grados de variabilidad. En la región codificadora, en los genes de envoltura E1 y E2, la región hipervariable 1 (HVR-1) muestra la mayor variación genética, por lo que ha sido utilizada para la identificación de las distintas variantes virales o cuasiespecies de los individuos infectados con el VHC [132]. La región HVR-1 es, probablemente, el mayor epítipo de neutralización del VHC y las mutaciones que se acumulan en esta región permiten al virus evitar su neutralización contribuyendo al establecimiento de infecciones persistentes.

La diversidad de las cuasiespecies del VHC puede, por tanto, contribuir al desarrollo de cronicidad durante la infección debido a los rápidos cambios que suceden en las proteínas de la envoltura viral como mecanismo de escape a la presión inmune ejercida por el huésped. Sin embargo, el escape inmunitario no parece ser el único mecanismo que utiliza el virus para persistir del huésped.

1.2.5. Epidemiología

El VHC es uno de los agentes causales importantes de enfermedad hepática, estimándose que entre 170–240 millones de personas en todo el mundo están infectadas crónicamente por el VHC. Las tasas de prevalencia de infección por el VHC son del 1–2% en Europa y EE.UU [133]. Además, se ha convertido en la etiología más común del carcinoma hepatocelular y en la primera causa de trasplante hepático en los adultos en el mundo occidental [109].

1.2.5.1. Vías de transmisión del VHC

Las principales vías de transmisión de la infección son las parenterales: la transfusión de hemoderivados y el consumo de drogas por vía parenteral (UDVP).

El mecanismo de transmisión del VHC más estudiado ha sido la propagación a través de donaciones de sangre contaminada, por lo que se implementaron procedimientos que garantizan la seguridad de las donaciones en los bancos de sangre [134]. Otras vías de transmisión son los trasplantes de órganos, pinchazos accidentales u otra exposición parenteral, incluyendo el uso inadecuado o la reutilización de agujas y jeringas en los centros de atención sanitaria [135, 136].

El uso de drogas intravenosas es uno de los principales factores de riesgo de infección en países desarrollados y la infección por el VHC es un hecho frecuente en pacientes infectados por el VIH [137]. Al igual que el VIH, el VHC se transmite por vía parenteral, mediante el intercambio de jeringuillas contaminadas, si bien el VHC es 10 veces más infeccioso que el VIH. En nuestro

medio se ha calculado que un 50-70% de los individuos con el VIH en España están o han estado coinfectados por el VHC [138].

El papel de la transmisión sexual del VHC no ha sido bien definido. Sin embargo, los informes en la última década han implicado la transmisión sexual del VHC entre los hombres infectados por el VIH que tienen sexo con hombres (HSH) [139].

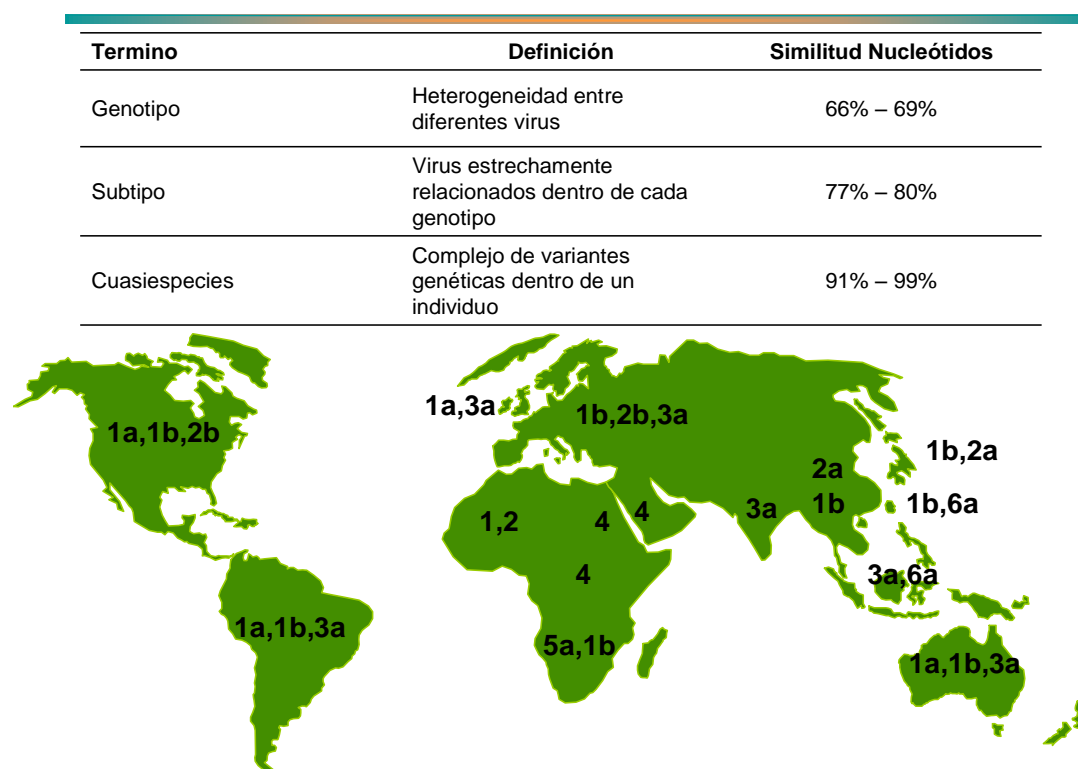
Otra vía de transmisión menos relevante es la vía materna (durante el embarazo, parto o lactancia), donde la probabilidad de transmisión vertical es del 10%, siendo mayor en mujeres coinfectadas por el VIH/VHC [140]. No se descarta que puedan existir otras rutas ya que un 10% de los casos aparecen sin evidencia de factores de riesgo, aunque es posible que estos individuos se hayan visto expuestos inadvertidamente a sangre o productos sanguíneos contaminados [141]. Aunque los mecanismos por los cuales el VHC persiste en el organismo son desconocidos, si se sabe que la variabilidad genética y la respuesta inmunológica deficiente son dos mecanismos de persistencia del VHC muy importantes [142].

1.2.5.2. Genotipo viral.

El genotipo viral juega un papel muy importante en los estudios de transmisión, en la epidemiología, la distribución geográfica y la respuesta al tratamiento antiviral. Basándose en la secuencia de nucleótidos y en el análisis filogenético, se han definido seis grupos mayores del VHC, llamados genotipos que se designan por números (genotipos 1 al 6) [143]. Estos genotipos, se han subdividido en subgenotipos (o subtipos) y se designan con letras minúsculas. Los genotipos tienen aproximadamente un 65% de homología entre sí, mientras que los subtipos muestran de un 77-79%.

Aunque los diferentes genotipos se pueden encontrar repartidos por todo el mundo, (**figura 10**), hay claras diferencias en cuanto a su distribución geográficas e incluso entre los diferentes grupos de población de una misma área geográfica [144]. Así pues, los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a se encuentran en el 90% de las infecciones por el VHC en América del Norte y en Sudamérica, Europa, Rusia, China, Japón, Australia y Nueva Zelanda; el genotipo 1b produce la mayoría de las infecciones del Este y Sur de Europa, China y Japón; el genotipo 3 es muy frecuente en América y Europa; y los otros genotipos se encuentran en Asia o África [145, 146].

El análisis evolutivo de todos los genomas disponibles del VHC apoya la hipótesis de que la selección inmune fue un motor importante en la divergencia de los genotipos del VHC [147].

Figura 10. Variantes del VHC y distribución mayoritaria de los distintos genotipos del VHC.

Es evidente que el genotipo del VHC es un importante marcador epidemiológico y puede alterar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico para la detección del VHC. La determinación del genotipo del VHC en combinación con otros marcadores, como la evaluación cuantitativa de ARN del VHC, puede ser útiles para el seguimiento de la hepatitis C crónica y determinar la eficacia y duración del tratamiento antiviral [148].

1.2.6. Historia Natural de la Infección por VHC.

1.2.6.1. Infección aguda.

La infección aguda por el VHC cursa en la mayoría de los casos de forma asintomática durante los primeros 6 meses después de la infección por el VHC (60-75%). Entre un 20 y un 30% de los pacientes desarrollan ictericia y un 10-20% presentan síntomas como disminución del apetito, fatiga, náuseas y vómitos que aparecen antes de que se produzca la seroconversión [149, 150].

Clínicamente, la mayoría de pacientes presenta una elevación de alanino-amino transferasa (ALT) de hasta diez veces el límite superior de normalidad pero el fallo hepático fulminante es excepcionalmente raro en la infección aguda por VHC. El diagnóstico de la infección en la fase aguda es difícil ya que puede que los anticuerpos contra el VHC no aparezcan hasta doce semanas después, y aproximadamente un tercio de las personas infectadas no presenta

anticuerpos detectables en el inicio de los síntomas. Por lo tanto, las técnicas de detección de ARN del VHC mediante PCR son las únicas pruebas fiables para el diagnóstico[151].

La hepatitis C aguda puede seguir tres cursos evolutivos [152]:

- En un 10-30% de los casos se normalizan las transaminasas de forma más o menos rápida y se negativiza el ARN-VHC, lo que marca la erradicación del virus con recuperación completa. Es recomendable confirmar la negatividad con una segunda determinación de ARN-VHC.
- En un 10-20% de los casos, el paciente experimenta una normalización de las transaminasas con persistencia de ARN-VHC positivo, constituyendo una hepatitis C crónica generalmente con lesión hepática mínima, aunque en una cuarta parte de los casos pueden cursar con una lesión hepática más grave.
- El 40-60% restante mantienen elevadas las transaminasas y positivo el ARN-VHC más allá de 6 meses tras la infección, con evolución a la forma crónica de la enfermedad, siendo a partir de este momento cuando pasa a considerarse el caso como hepatitis C crónica.

1.2.6.2. Infección crónica.

La hepatitis C crónica se define como la infección por el VHC que persiste por más de seis meses. Una vez que la cronicidad se ha establecido ya no tiene lugar la resolución espontánea de la viremia [153]. Clínicamente, es a menudo asintomática, y es en su mayoría descubierto accidentalmente.

El curso natural de la hepatitis C crónica varía considerablemente de una persona a otra [154]. La infección crónica del VHC se caracteriza por lesiones inflamatorias en el hígado, a menudo acompañadas de la acumulación de lípidos (esteatosis) y de fibrosis progresiva de grados variables, y a largo plazo hay progresión a cirrosis y carcinoma hepatocelular [155]. Aunque casi todos los pacientes tienen evidencia de inflamación en la biopsia hepática, la tasa de progresión de fibrosis muestra una gran variabilidad entre los individuos [152]. Cofactores como la edad a la infección, el alcohol, las coinfecciones y esteatosis hepática aceleran la progresión de la enfermedad [153, 156, 157].

La enfermedad crónica inicialmente leve indica que la evolución a corto plazo siempre es benigna. Sin embargo, la progresión de la fibrosis hepática se puede observar a largo plazo (> 5-7 años), especialmente en aquellos casos que tienen los niveles de transaminasas elevadas y/o fluctuante. El riesgo de progresión de la enfermedad hepática hacia la fibrosis/cirrosis es mínimo en 10-15 años en los portadores del VHC con ALT persistentemente elevada.

Aproximadamente el 10-20% de los pacientes con hepatitis C crónica tiene niveles de ALT persistentemente normales. En estos pacientes, el daño hepático suele ser leve y la fibrosis, generalmente, ausente o mínima y presentan una menor tendencia a la progresión del estadio fibrótico que los pacientes con transaminasas elevadas. Aunque la mayoría de los datos parecen mostrar que pacientes con niveles de ALT normales presentan una enfermedad leve y estable, con un pronóstico favorable, varios estudios han demostrado que existe una progresión significativa de fibrosis en el 20-30% de estos pacientes [158]. Recientemente, se ha publicado que el nivel de ALT es un marcador no muy fiable de inflamación y fibrosis [159].

Se han señalado varios factores que pueden acelerar el curso de progresión de la fibrosis en sujetos infectados por el VHC [160-163]. La mayoría hacen referencia a características en relación al huésped, como son la edad superior a 40 años en el momento en que se contrajo la infección, el sexo masculino, el consumo de alcohol, la coinfección con el VHB o el VIH, el tabaquismo y el estado del sistema inmunitario del paciente en el momento de la infección.

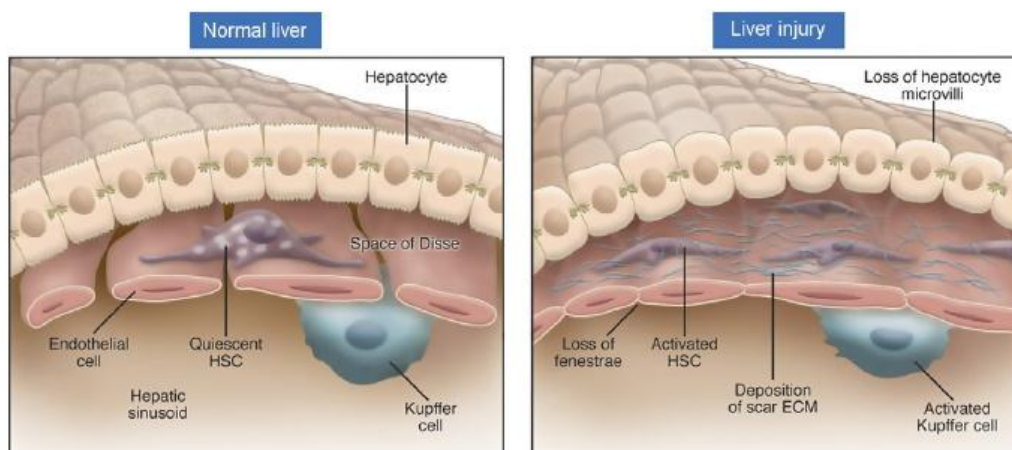
El VHC induce una acumulación de lípidos y esteatosis hepáticas, donde se encuentran implicados tanto factores virales como del huésped [164]. El VHC también puede inducir resistencia a la insulina a través de la interferencia de proteínas del VHC con las rutas de señalización intracelular de la insulina. Así, en pacientes infectados por el VHC, la resistencia a la insulina está más fuertemente asociada con la CV del VHC que con la obesidad. La esteatosis y la resistencia a la insulina han sido asociadas con la progresión de fibrosis y con un bajo grado de respuesta virológica sostenida a peginterferón (Peg-IFN) y RBV (Ribavirina) [165].

1.2.6.3. Enfermedad hepática.

El hígado es un órgano con gran capacidad de regeneración [166]. Tras un daño hepático autolimitado (ej. una hepatitis aguda) se produce una rápida respuesta regenerativa de los hepatocitos que sustituyen el tejido necrótico, restableciendo la arquitectura hepática normal. Durante este proceso reparativo, existe una reacción inflamatoria junto a un depósito de matriz extracelular constituido por colágeno no fibrilar, que servirá de tejido de sostén para los hepatocitos regenerados y que contribuye a recomponer el lobulillo hepático dañado [167]. Sin embargo, si la necrosis hepática es mantenida, este proceso reparativo se perpetua y con el tiempo la capacidad de regeneración hepática disminuye, mientras que aumenta considerablemente la producción de matriz extracelular que se deposita de manera desorganizada en el lobulillo hepático [167]. En fases avanzadas, la población normal de hepatocitos ha sido parcialmente sustituida por abundante matriz extracelular formada por

colágeno fibrilar y otras proteínas como la fibronectina y diversos glicosaminoglicanos. Las bandas de colágeno son muy evidentes y unen a varios espacios porta, que se denominan “puentes de fibrosis”. Esta condición precede a la formación de nódulos de regeneración y, por tanto, al desarrollo de cirrosis (**Figura 11**).

Fig. 11. Comparación de acontecimientos celulares en la lesión hepática [168].



La fibrosis hepática es pues el depósito de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular que ocurre en la mayoría de enfermedades hepáticas crónicas [167, 169]. Las principales consecuencias clínicas de la fibrosis hepática avanzada son la hipertensión portal y la insuficiencia hepática, que son debidas a un aumento de la resistencia del flujo sanguíneo intrahepático y a una disminución de la masa funcionante de hepatocitos, respectivamente [170].

Hay dos “end-points” críticos, la presencia de fibrosis significativa que es una indicación de tratamiento antiviral frente al VHC, y la presencia de cirrosis, que es una indicación de un control específico de las complicaciones relacionadas con la hipertensión portal y al aumento del riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular [171].

1.2.7. Diagnóstico de fibrosis.

1.2.7.1. Biopsia hepática.

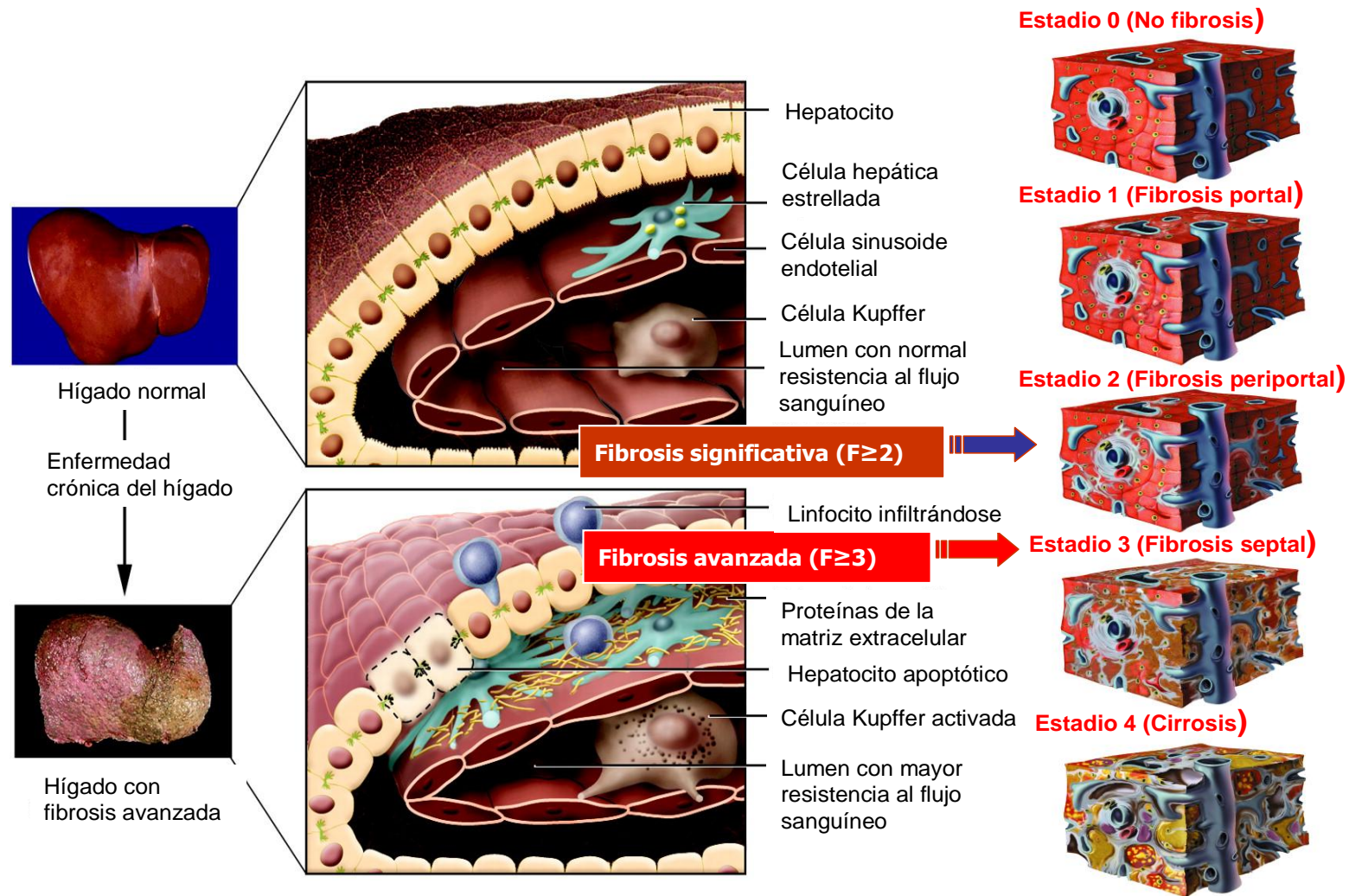
La evaluación histológica de la fibrosis es una evaluación que combina información sobre la cantidad de fibrosis y la desorganización de la arquitectura cuantificada en un sistema de puntuación semi-cuantitativo como la escala Metavir [172, 173].

En hepatitis C crónica, la biopsia hepática se utiliza principalmente para clasificar el estadio de fibrosis. Además, la evaluación simultánea de la necro-inflamación (inflamación del tracto portal,

hepatitis de interface, inflamación lobular) permite evaluar si la fibrosis es el resultado de un suceso pasado que se ha estabilizado o incluso una regresión, o es un proceso continuo que pueden seguir empeorando. Por último, además de la fibrosis, la biopsia hepática también detecta lesiones asociadas, tales como esteatosis, esteatohepatitis, la sobrecarga de hierro, y el alcohol que proporcionan información útil para el manejo del paciente y el pronóstico.

El método Metavir para evaluar las biopsias hepáticas fue específicamente diseñado para pacientes con hepatitis C crónica [174]. Esta clasificación comprende un grado y un estadio. El grado informa sobre la actividad (nivel de inflamación) y el estadio indica la cantidad de fibrosis. Al grado, o nivel de actividad, se le asigna un número basado en la intensidad de las lesiones inflamatorias. Dichas lesiones producen daños a las células que terminan con la degeneración y la muerte de las mismas. En una escala de 0-3 ó 4 (según el histopatólogo), 0 indica ausencia de actividad y 3 ó 4 significa actividad intensa. Esta evaluación es importante, ya que los cambios inflamatorios son precursores de la fibrosis. Si el grado de actividad es alto, significa que la inflamación del hígado va a ocasionar cicatrices. Para clasificar la fibrosis, también se utiliza una escala de 0-4: 0= no hay fibrosis, 1= fibrosis portal sin tabiques (fibrosis limitada al tracto portal), 2= pocos tabiques (escasos tractos fibrosis que salen de la tríada portal), 3= fibrosis en puentes (porto-portales o porto-centrales) y 4= cirrosis (tractos fibrosos encinturando nódulos de regeneración con alteración de la arquitectura hepática) (**Figura 12**).

Figura 12. Proceso fibrosis y cirrosis. Escala METAVIR: evaluación del estado de la enfermedad hepática [175]



1.2.7.2. Marcadores no invasivos de Fibrosis.

La biopsia de hígado ha sido durante muchos años la única herramienta para evaluar la fibrosis hepática [176]. Sin embargo, su carácter invasivo, y el error de muestreo derivado de la propia heterogeneidad de la fibrosis hepática han espoleado desde hace años la búsqueda de técnicas y marcadores no invasivos alternativos [177, 178]. Estas estrategias no invasivas se dividen en dos categorías principales:

a) Los **métodos físicos** como la elastometría (FibroScan, Echosens, etc.) que mide la rigidez hepática [172, 179]. Esta elastometria cuantifica la onda de pulso para que pasa a través del tejido hepático. Se mide su velocidad de propagación, que está directamente relacionada con la rigidez o elasticidad del tejido: La rigidez del hígado se expresa como kilo pascales (kPa) y se correlaciona con el estado de fibrosis en hepatitis crónica C. A mayor rigidez del tejido, más rápido se propaga la onda. Esta técnica es la mejor validada entre las técnicas de imagen no invasivas, con una excelente precisión en la fibrosis avanzada y cirrosis. Sin embargo, su exactitud varía más en fases menos avanzadas de fibrosis. Por otra parte, la elastometría es un método independiente del observador, cuya reproducibilidad parece ser alta.

b) Los **métodos biológicos**, que se refieren a la medición en sangre (plasma y suero) de moléculas relacionadas con la fibrosis e inflamación hepática [172]. Los niveles varían según el grado o estadio de la enfermedad [180]. Los métodos biológicos se pueden dividir a su vez en métodos:

- **Directos**, como los marcadores que reflejan la deposición de matriz extracelular (como el péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I, el péptido aminoterminal del procolágeno tipo II, el inhibidor tisular de las metaloproteinasas o el transforming growth factor beta), la degradación de la matriz extracelular (péptido C del procolágeno IV, péptido N del procolágeno IV, colágeno IV, metaloproteinasas, ácido Hialurónico) [181]; o una combinación de varios marcadores directos de fibrosis como el European Liver Fibrosis [182] (propeptido III del colágeno, TIMP-1 y ácido Hialurónico), el Fibrospect [183] (α 2-macroglobulina, TIMP-1 y ácido Hialurónico) o el SHASTA [184] (GOT, albúmina y ácido Hialurónico).

- **Indirectos**, que no reflejan directamente el metabolismo de la matriz extracelular pero si proporciona una alteración de la función hepática [185], como los diferentes índices elaborados con pruebas de laboratorio convencionales (aminotransferasas, recuento plaquetario, colesterol) [186-188] tales como el índice de Forns [187], APRI [188], y el Fibrotest [189] entre otros.

- **Algoritmos**, o la combinación de varios de estos índices no invasivos en algoritmos que permiten aumentar la fiabilidad diagnóstica para identificar pacientes con fibrosis, pero también aumenta su complejidad y limita su aplicación. El algoritmo SAFE (sequential algorithm for fibrosis evaluation) combina de forma secuencial el test APRI y el Fibrotest®, identificando con una fiabilidad >90% al 50% de los pacientes con fibrosis significativa (F2-4) y al 70% de los pacientes con cirrosis[173].

1.2.7.2.1. Aplicación clínica de los marcadores no invasivos de Fibrosis.

Un marcador de fibrosis debería ser específico del órgano, fácil de realizar, reproducible y barato. Sin embargo, los biomarcadores de fibrosis no son específicos del hígado y pueden estar alterados con la existencia de un proceso inflamatorio u otras enfermedades. Además no debería servir únicamente para estadificar la fibrosis sino también para monitorizar la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento [190]. Debe ser independiente de las alteraciones metabólicas, que se excreten poco por vía urinaria y biliar, ser capaces de detectar fibrosis independientemente de la causa, entre otras. Las posibles aplicaciones de los marcadores no invasivos incluirían la valoración inicial y la monitorización de la terapia antiviral y deberían, además, aportar nueva información de la historia natural de la progresión y de la regresión de la fibrosis.

Hay que tener en cuenta que muchos de los marcadores serológicos de fibrosis no se miden de rutina en la práctica clínica. Por otro lado, al ser la infección por el VIH una enfermedad caracterizada por una inmunosupresión crónica, muchos de estos marcadores pudieran verse afectados por la propia infección por VIH o por la TAR (aumento de la bilirrubina por atazanavir, aumento de la GGT por los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos o aumento del colesterol en relación a inhibidores de las proteasa) [184, 190, 191].

En pacientes no tratados, y sin la existencia de otra enfermedad, el uso de elastometría y los marcadores serológicos pueden ser utilizados para la evaluación de su enfermedad en una primera fase. Sin embargo esta estrategia también debe tener en cuenta el genotipo de VHC, la disponibilidad de los biomarcadores y clínicamente ninguna variable relevante. Por ejemplo cuando hay una sospecha de cirrosis, el uso de elastometría puede ser suficiente para confirmar el diagnóstico sin realizar la biopsia hepática [172, 179].

1.2.7.3. Cirrosis y hepatocarcinoma.

La cirrosis descompensada y el hepatocarcinoma son las indicaciones más frecuentes de trasplante hepático, y ambos, se prevé que dupliquen sus cifras en los próximos 20 años [192]. Existen muy variados factores que influyen de forma decisiva en la evolución clínica de la hepatitis C crónica, que puede variar entre la progresión a cirrosis y carcinoma hepatocelular, o por el contrario, progresar de forma lenta e insidiosa con síntomas mínimos.

La progresión a cirrosis está bien documentada [193, 194]. Entre el 15% y el 25% de los pacientes con hepatitis C crónica desarrollan cirrosis a lo largo de 5 a 10 años. Los factores más relacionados con la progresión a cirrosis son el grado de daño hepático en la biopsia inicial, la edad de exposición al virus y la duración de la infección VHC. Otros factores que pueden influir en la progresión son la presencia de otras infecciones, la ingesta excesiva de alcohol, el estado inmune del huésped y el mecanismo de transmisión [195, 196]. El alcoholismo aumenta la gravedad de los cuadros clínicos y la frecuencia de padecer carcinoma hepatocelular en pacientes con cirrosis. La cirrosis y sus complicaciones son más frecuentes en pacientes mayores de 60 años, independientemente de cuando ocurre la infección [197].

El carcinoma hepatocelular es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo [198]. Los pacientes con cirrosis tienen un riesgo anual del 1-4% de desarrollar este tipo de cáncer [199]. La infección por el VHC está implicada en el aumento de la incidencia de esta patología en muchos países desarrollados, incluyendo España, donde la proporción atribuible al VHC oscila del 50% al 70% de los hepatocarcinomas [200, 201].

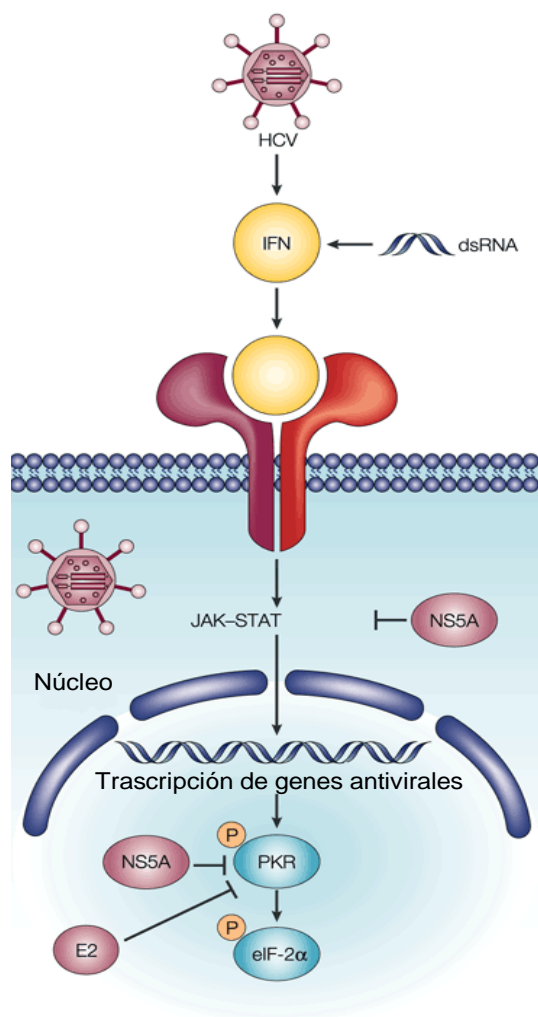
1.2.8. Tratamiento antiviral contra el VHC.

Durante muchos años, el IFN- α pegilado (Peg-IFN- α) en combinación con ribavirina (RBV) fue el único tratamiento con cierta eficacia frente al VHC. La tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) es de aproximadamente el 45% en los pacientes con genotipo 1 y 4; y alrededor del 80% en los pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 [202, 203]. En la actualidad, se dispone de dos tipos de interferones pegilados, uno basado en IFN α -2a (Peg-IFN- α -2a) unido a una cadena ramificada de 40 kD y otro basado en IFN- α -2b (Peg-IFN α -2b) unido a una cadena de lineal de poli-etilen-glicol (peg) de 12 kD. En ambos casos, su prolongada semivida permite administrarlos en una única dosis semanal por vía subcutánea.

El IFN- α es una citocina secretada por la célula en respuesta a una infección viral, produciendo simultáneamente una activación de la respuesta inmunitaria del hospedador y la inhibición de la

multiplicación del virus. Actúa uniéndose a su receptor de membrana, e induciendo la proteinquinasa R celular (PKR) que fosforila el factor eIF2 α , iniciando una cascada de reacciones que desembocan en el aumento de la expresión de ciertos genes inducidos por IFN (ISG) [204] (**Figura 13**). Induce ciertas actividades celulares como la disminución de la presencia del receptor CD81 en la membrana de las células hepáticas, responsable de la unión con la proteína de la envuelta viral E2, dificultando así el anclaje de las partículas víricas [205].

Figura 13. Modo de acción de IFN- α como terapia antiviral.[206]



La RBV, también conocida como *Virazole*, es un nucleótido sintético en el que la base nitrogenada es la tiazolcarboximida. La ribavirina sufre un proceso de fosforilación en las células infectadas utilizando enzimas tisulares como la adenosin-quinasa.

La RBV entra en la célula hepática como un profármaco y es convertida en monofosfato, difosfato y trifosfato de ribavirina, a través de una acción secuencial de 3 kinasas celulares. Hasta este momento se han propuesto los siguientes mecanismos de acción:

1) Favorece la inmunidad del huésped frente al VHC potenciando una respuesta Th1 con aumento de citocinas como IFN-gamma y TNF-alfa e IL-2, que aumenta la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones. Se piensa que el IFN y la RBV favorecen la respuesta inmunológica a través de los NK y linfocitos T, consiguiendo la muerte de las células infectadas por el VHC [207].

2) Inhibición de IMPDH (inosina monofosfato deshidrogenasa) [204, 208], una enzima que transitoriamente depleciona el pool intracelular de trifosfato de guanosina, que es esencial para la transcripción viral y la replicación de los virus ARN. No obstante, otros inhibidores específicos de IMPDH como el merimepodib (VX-497) no han demostrado de una manera clara un efecto antiviral frente al VHC.

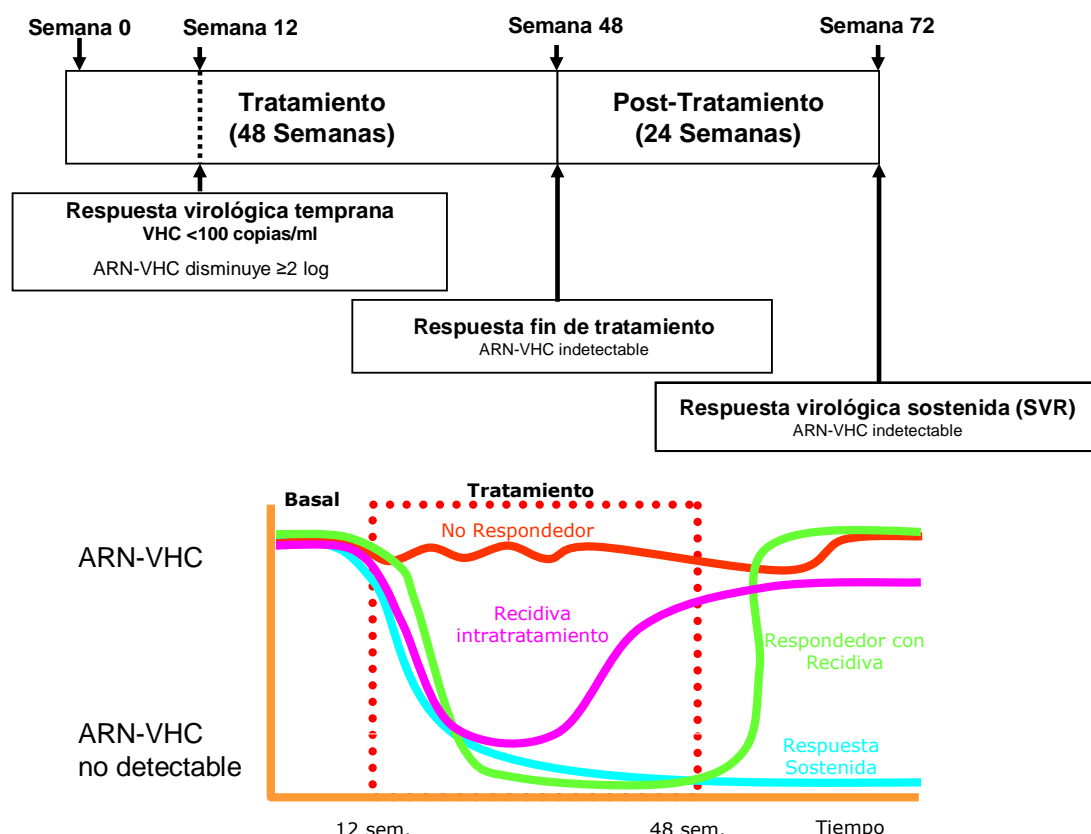
3) Tampoco parece que la RBV sea un potente inhibidor de la ARN polimerasa, ya que sólo produce una leve disminución de la carga viral ($<0,5 \log_{10}$), y no aumenta la pendiente de la primera fase de reducción del ARN-VHC. Este efecto es transitorio y desaparece al cuarto día. Al añadir el IFN alfa la reducción diaria de la carga viral en la primera fase fue de $2 \log_{10}/\text{día}$, y en la segunda fase de $0,15 \log_{10}/\text{día}$. Se podría pensar que la RBV es un adyuvante del IFN alfa, ya que aparentemente no disminuye la carga viral. La realidad es que la RBV tiene un efecto sinérgico, y actúa cooperando y potenciando al IFN alfa [204, 208]. Este efecto se observa sobre todo en pacientes con genotipo 1.

4) Por último, la RBV actuaría como un mutágeno del VHC [204, 208], al incorporarse dentro de los nuevos genomas sintetizados, dando lugar a mutaciones inducidas por la RBV en el genoma viral y originando un “error catastrófico” de la replicación (mutaciones suicidas). El resultado final es que los viriones infecciosos van desapareciendo, y se evita que el virus ataque a los hepatocitos sanos.

1.2.9. Duración y seguimiento del tratamiento antiviral combinado.

La duración óptima del tratamiento antiviral con Peg-IFN- α y RBV varía en función del genotipo viral [171]. Los pacientes que presentan genotipo 1 o 4 son tratados durante 48 semanas y los pacientes con genotipo 2 y 3 durante 24 semanas. Los pacientes con genotipo viral 1 y 4 que finalizan las 48 semanas de tratamiento con ARN del VHC indetectable en suero deben volver a ser analizados 24 semanas más tarde para establecer si se ha logrado la RVS (**Figura 14**). Los pacientes con genotipo 2 y 3 que finalizan las 24 semanas de tratamiento con ARN del VHC indetectable en suero también deben volver a ser analizados 24 semanas más tarde.

Figura 14 .Terapia antiviral y criterios de respuesta.



El seguimiento de la cinética viral durante las primeras fases del tratamiento es crucial para la toma de decisiones en cuanto a la eficacia del tratamiento y la optimización de su duración. En aquellos pacientes en los que la CV no sea indetectable ni se haya reducido 2 logaritmos en base 10 a la semana 12 de iniciar el tratamiento, éste puede ser interrumpido [171]. No obstante, la decisión de continuar puede individualizarse en función de la gravedad de la enfermedad hepática, de la tolerancia y de la presencia de algún grado de respuesta [209]. También es interesante la determinación de la CV a las 4 semanas del inicio del tratamiento para determinar la respuesta virológica rápida (RVR, CV indetectable en la semana 4), la cual tiene un alto valor predictivo de alcanzar una RVS (CV indetectable 6 meses después de finalizado el tratamiento) [210].

El VHC ha desarrollado un rango de mecanismos de evasión de las defensas del huésped que están centradas alrededor de las actividades de la proteína NS5A [211], la cual se une e inactiva a la PKR [212].

1.2.9.1. Nuevas terapias antivirales frente al VHC

En estos últimos años están apareciendo nuevos antivirales de acción directa (AAD) que van dirigidos contra enzimas del VHC, como la proteasa o la polimerasa, que son activos por vía oral y se toleran aceptablemente. Estos AAD se utilizarían en terapia combinada junto con Peg-IFN- α y/o RBV. Esta terapia combinada posee una elevada potencia inhibidora de la replicación viral así como un efecto activador de la inmunidad endógena. Los dos inhibidores de proteasas aprobados actualmente son el Telaprevir y Boceprevir, los cuales han mostrado una gran eficacia en los ensayos clínicos, tanto en el tratamiento inicial de la hepatitis C como en pacientes no respondedores[213, 214].

La resistencia a la insulina es un factor que se asocia a una peor respuesta al tratamiento antiviral frente al VHC. Por ello, mejorar la sensibilidad a la insulina podría ser un complemento útil para mejorar la tasa de respuesta al tratamiento antiviral[164].

1.2.9.2. IL28B y respuesta al tratamiento frente al VHC.

En varios estudios de asociación genética con técnicas de rastreo completo de genoma (Genome Wide Association Study, o GWAS) se han identificado varios polimorfismos que se localizan dentro o en las inmediaciones de los genes que codifican para la familia del IFN-lambda (cromosoma 19 (19q13)), los cuales se han asociado con la eliminación espontánea del HCV y con la respuesta al tratamiento del HCV[215].

El gen *IL28B* codifica la interleucina 28, también conocido como IFN-lambda-3. La IL28B es un mensajero químico de las reacciones inmunológicas que presenta actividad antiviral (citocina relacionada al IFN-alfa) y que presenta una fuerte asociación con la RVS tras tratamiento combinado con peg-INF-alfa+RBV en pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC [216-218]. Las variantes más estudiadas son un cambio de citosina por timina en rs12979860 C/T o timina por guanina en rs8099917 T/G [219]. Concretamente, el genotipo rs12979860 CC constituye un factor predictivo independiente de la respuesta favorable a la terapia antiviral [220]. Según estos estudios, este polimorfismo es el mejor marcador genético que predice la respuesta al tratamiento combinado IFN-peg/RBV tanto en pacientes mono infectados con VHC y como coinfectados con VIH y VHC[221, 222].

1.3. Coinfección VHC/VIH.

La coinfección con el VHC en pacientes infectados por el VIH es un hallazgo frecuente en virtud de las similares vías de transmisión que estos agentes presentan (parenteral, sexual y vertical).

De los 40 millones de personas infectadas con VIH en todo el mundo, un 4-5 millones están infectados con VHC. En Europa la prevalencia de coinfección en pacientes infectados por VIH es de alrededor del 33% para VHC [223]. En España se ha calculado que un 50-70% de los individuos con el VIH están o han estado coinfectados por el VHC [138].

Desde la introducción del TARGA, la historia natural de la infección por el VIH ha cambiado drásticamente [224]. El descenso de la incidencia de infecciones oportunistas y la consiguiente mayor supervivencia de los pacientes ha dejado paso a la aparición de otras complicaciones no relacionadas con SIDA [225]. Esto ha sido particularmente evidente en los pacientes coinfectados por el VIH/VHC, en los que la enfermedad hepática crónica es actualmente una causa principal de hospitalización y mortalidad en muchos países desarrollados[226].

El VIH modifica la historia natural de la hepatitis crónica C, acelerando la progresión a fibrosis, cirrosis y descompensación hepática [224, 227]. Por otro lado, la infección por VHC modifica la historia natural del VIH promoviendo la aparición de eventos relacionados con SIDA y una rápida progresión de la enfermedad[228] [228].

1.3.1. Tratamiento antiviral del VHC en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

Todas las personas VIH con infección crónica por el VHC deben ser considerados como candidatos potenciales para la terapia frente al VHC, dado el alto riesgo de progresión a cirrosis y al estadio terminal de la enfermedad hepática. El momento para el tratamiento del VHC debe decidirse sobre una base individual [229]. La decisión acerca del inicio del tratamiento de los pacientes coinfectados con VIH/VHC es compleja, ya que hay que tomar en cuenta factores individuales como el estado de la enfermedad del VIH, el estadio de fibrosis hepática, la probabilidad de RVS, los riesgos potenciales de la terapia y las comorbilidades [230, 231].(**Tabla 5**).

Tabla 5 Factores asociados con respuesta virológica sostenida en la terapia contra el VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC [230].

HUÉSPED	VIRUS	TRATAMIENTO
Raza	Genotipo	Dosis Peg-IFN
Edad	Concentración de ARN-VHC	Dosis de Ribavirina
Fibrosis hepática	ARN-VHC indetectable en la semana 4	Adherencia
IMC		Tratamiento concomitante con didanosina o zidovudina
RI		Uso de factores de crecimiento hematopoyéticos
Esteatosis hepática		
Cifra de CD4		
Abuso de alcohol		
Enfermedad psiquiátrica		

Abreviaturas: Peg-IFN: interferón pegilado; VHC-ARN: CV de VHC; IMC: índice de masa corporal.

En los últimos años se ha demostrado la eficacia y seguridad del tratamiento con Peg-IFN- α y RBV en los pacientes coinfectados por VIH/VHC [232]. Esta terapia antiviral puede desembocar en una RVS que conduce a la erradicación del VHC pero la respuesta virológica es todavía inferior a la obtenida en pacientes mono infectados con VHC [229]. Además, es mayor el número de interrupciones del tratamiento debido a la aparición de efectos adversos.

Tanto el peg-IFN como la RBV actúan como inmunomoduladores, de modo que la deficiencia inmunológica que provoca la infección por el VIH puede tener un impacto negativo sobre su eficacia, incluso en pacientes con una cifra elevada de linfocitos T-CD4⁺ y/o ARN-VIH indetectable [233].

Los trastornos psiquiátricos graves no controlados, y el abuso de alcohol o drogas ilegales en general contraindican el tratamiento antiviral del VHC. Sin embargo, la metadona y la cirrosis no

descompensada no son contraindicaciones para la terapia [229]. El tratamiento de pacientes con cifras muy bajas de células T-CD4⁺ es menos eficaz y potencialmente arriesgado, por lo tanto, no debe ser aconsejado [191]. En individuos no tratados previamente con cifras adecuadas de células T-CD4⁺, el tratamiento de la hepatitis C debe ser prioritario. Estos pacientes además se beneficiarán de una mayor tolerancia a los medicamentos antirretrovirales [234].

1.3.2. Tratamiento antirretroviral del VIH en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

El tratamiento para el VIH, y específicamente con IPs, ha generado dudas sobre el manejo de pacientes coinfectados con el VHC por la hepatotoxicidad que se puede presentar con estos antirretrovirales. La existencia de hepatotoxicidad grave debe suponer la retirada del TAR.

Se han postulado tres mecanismos como causantes de alteración hepática durante el tratamiento con la TARGA [235]: a) los IPs pueden producir toxicidad directa sobre el hígado; b) el denominado "Síndrome de Reconstitución Inmunológica" puede empeorar el daño hepático asociado a la infección por el VHC y c) la TARGA puede resultar en un aumento de la CV del VHC.

El desarrollo de hepatotoxicidad en el curso del TARGA no es infrecuente. Así, su incidencia entre 10.611 pacientes incluidos en 21 estudios de ACTG (*AIDS Clinical Trial Group*) fue del 9% con una mortalidad atribuible del 2,5% [236]. La mayor incidencia de toxicidad se ha visto con Ritonavir, en comparación con otros IPs; en presencia de infección por el VHC, la toxicidad severa se puede ver hasta en el 12,2% de los casos [237]. En general, los valores sanguíneos de los IPs se ven elevados en pacientes que tienen hepatopatía crónica asociada, por lo cual, sería recomendable realizar mediciones en sangre de los ARV para mantener los valores terapéuticos adecuados. De todos modos, la evidencia actual no justifica el no uso de IPs en pacientes coinfectados con el VHC e incluso con el virus de la hepatitis B (VHB).

También se han publicado algunos informes de posible toxicidad hepática por INRTs, con elevaciones de hasta dos veces el control de las transaminasas hepáticas, con descenso de las mismas a las dos semanas de interrumpir el tratamiento [238].

Justificación, hipótesis y objetivos

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.

2.1.1. Test no invasivos de fibrosis hepática.

La estadificación de la fibrosis hepática se considera que es una parte esencial en el manejo de la hepatitis crónica C, ya que proporciona información sobre el pronóstico y, en muchos casos, ayuda en las decisiones terapéuticas. Los pacientes con hepatitis crónica C y fibrosis hepática significativa tienen un riesgo elevado de desarrollar cirrosis en la década siguiente, por lo que estos pacientes, así como aquellos con cirrosis hepática establecida, tienen una necesidad real de iniciar el tratamiento antiviral del VHC.

Durante años, el diagnóstico y la estadificación de la fibrosis hepática se han basado en la biopsia de hígado, un procedimiento invasivo no exento de complicaciones [172, 239]. En los últimos años, estas limitaciones han llevado al desarrollo de procedimientos alternativos incruentos para estimar la fibrosis hepática; haciendo que la determinación de la fibrosis hepática sea más cómoda para pacientes y médicos, pudiéndose repetir de forma periódica sin muchos problemas.

Actualmente, hay muchas pruebas no invasivas para la determinación de la fibrosis hepática, pero la mayoría de ellas han sido establecidos en pacientes mono infectados por el VHC [172, 239].

2.1.2. Respuesta al tratamiento antiviral frente al VHC con peg-IFN- α +RBV.

Los pacientes coinfectados por el VIH y el VHC responden peor al tratamiento con peg-IFN- α +RBV que los mono infectados por VHC [229]. En los pacientes coinfectados, la menor respuesta al tratamiento se ha relacionado con factores virales y del huésped, destacando la alteración del sistema inmune producida por el VIH.

Nuestra atención se ha centrado en determinar el papel de las quimiocinas en la respuesta al tratamiento con IFN-alfa/RBV en pacientes coinfectados por VIH y VHC. Las quimiocinas juegan un papel en la regulación del tráfico y el reclutamiento de leucocitos que se infiltran en el hígado durante la infección crónica por el VHC [240]. Además, las quimiocinas también pueden estar implicados en la regeneración del hígado, la fibrosis, y en la transformación maligna, que puede ser inducida por la persistencia de la inflamación [241].

3. Hipótesis

La hipótesis de esta tesis es que se pueden determinar biomarcadores en sangre periférica que pueden predecir tanto el estadio de fibrosis hepática en pacientes coinfectados por el VIH/VHC como la respuesta al tratamiento con IFN-alfa/RBV.

4. Objetivos

El objetivo es determinar biomarcadores en sangre periférica relacionados con la respuesta inmune innata y con el proceso de fibrosis hepática de pacientes coinfectados por el VIH/VHC para proponer:

1. Marcadores predictivos de fibrosis hepática y construir un algoritmo que sea útil para el diagnóstico no invasivo de fibrosis hepática, y evaluar estos marcadores frente a los índices no invasivos ya existentes.
2. Marcadores predictivos de respuesta al tratamiento antiviral frente al VHC con peg-IFN- α +RBV en pacientes coinfectados por VIH y VHC.

Sujetos de estudio y métodos

5. Sujetos de Estudio y Métodos

5.1. Población de estudio.

La población de estudio está formada por pacientes coinfectados por VIH/VHC de la Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, España).

Todo el trabajo se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes dieron su consentimiento escrito y el Comité de Ética Institucional aprobó el estudio.

5.1.1. Pacientes coinfectados por VIH/VHC sin tratamiento antiviral frente al VHC.

Se incluyeron pacientes coinfectados por VIH/VHC que se sometieron a una biopsia hepática entre mayo de 2000 y mayo de 2007. Las biopsias de hígado se realizaron en pacientes que fueron candidatos potenciales para iniciar la terapia antiviral frente al VHC y no habían recibido tratamiento previo con IFN- α . El diseño del estudio fue transversal ya que solo se analizó una muestra por paciente.

Los criterios de inclusión fueron: a) tener realizada la biopsia hepática; b) ausencia tratamiento previo frente al VHC; c) disponibilidad de muestras de plasma congelado en el día de la biopsia hepática; d) no evidencia clínica de descompensación hepática; e) ARN-VHC detectable mediante PCR; f) Test para antígeno de superficie de la hepatitis B negativo; g) una cifra de linfocitos T-CD4⁺ mayor de 200 células / μ L; y h) TARGA estable o no necesidad de tratamiento antirretroviral. Los criterios de exclusión fueron: a) presencia de infecciones oportunistas activas; b) drogadicción activa o abuso de alcohol.

De nuestra cohorte de 361 pacientes con datos biopsia hepática, sólo pudieron incluirse, por tener una muestra de suero recogida y congelada, a 201 pacientes en el estudio del HA y a 195 pacientes en el estudio del HGM-3. El grupo de pacientes excluidos, por no disponer de una muestra de suero, mostró algunas diferencias significativas con respecto a los pacientes incluidos en el estudio:

- a) En el número de pacientes en tratamiento antirretroviral con NNRTI (incluido (104/201 pacientes (51,7%)) vs. excluidos (57 /160 pacientes (36,3%)), $p < 0,05$),
- b) En el diagnóstico de fibrosis avanzada (incluidos (41/201 pacientes (20,4%)) vs. excluidos (18/160 pacientes (11,3%)), $p < 0,05$),

- c) En el número de pacientes con carga viral de VIH indetectable (incluidos (156 / 201 pacientes (77,6%)) vs. excluidos (90/160 pacientes (56,3%)), $p < 0,05$),
- d) En el número de pacientes con carga viral del VHC > 850.000 copias/ml (incluido (125/201 pacientes (75,8%)) vs. excluidos (95/160 pacientes (63,3%)), $p < 0,05$)
- e) En los niveles plasmáticos de AST (incluido (57 UI/L) vs excluidos (65,5 UI/L), $p < 0,05$).

5.1.2. Pacientes coinfectados por VIH/VHC en tratamiento antiviral frente al VHC.

Se incluyeron pacientes coinfectados por VIH/VHC que iniciaron el tratamiento antiviral contra el VHC entre julio del 2000 y febrero del 2009. El diseño del estudio fue longitudinal retrospectivo ya que se estudiaron las muestras basales antes de indicar la terapia antiviral frente al VHC y la posterior respuesta virológica a 12, 24, 48 y 72 semanas después de iniciar el tratamiento antiviral.

Los criterios de inclusión fueron: a) Iniciar tratamiento frente al VHC con IFN- α y RBV; b) disponibilidad de muestras de plasma congelado en el día inicio de la terapia anti-VHC; c) no evidencia clínica de descompensación hepática; d) ARN-VHC detectable mediante PCR; e) Test para antígeno de superficie de la hepatitis B negativo; f) recuento linfocitos T-CD4⁺ mayor de 200 células/uL; y g) TARGA estable o no necesidad de la terapia antirretroviral.

Los criterios de exclusión fueron: a) presencia de infecciones oportunistas activas; b) drogadicción activa o la adicción al alcohol; c) tratamiento previo frente al VHC con IFN- α ; d) Abandono o interrupción prematura del tratamiento anti-VHC debido a eventos adversos; e) presencia de diabetes mellitus.

Los pacientes fueron tratados durante 48 semanas con la combinación de IFN- α + RBV. Se utilizaron tres tipos de interferones: IFN pegilado-no estándar α -2b (Intron-A, Schering-Plough, Alcobendas, Madrid) a una dosis de 3 millones de unidades (MU) tres veces por semana, PEG-IFN- α -2a (Pegasys, Roche Farma, SA, Madrid) a una dosis de 180 μ g por semana, o peg-IFN- α -2b (Peg-Intron de Schering-Plough, Alcobendas, Madrid) a una dosis de 1,5 μ g/kg por semana. Todos los pacientes recibieron ribavirina (Rebetol, Schering-Plough, Alcobendas, Madrid) a una dosis de 800 a 1200 mg por día según el peso corporal. La terapia anti-VHC se detuvo en todos los pacientes con ARN-VHC detectable en la semana 24 de tratamiento.

Para evaluar la respuesta virológica, se determinó el nivel plasmático basal de ARN del VHC en la semana 12, 24, 48 y 72. Se definió como respuesta virológica sostenida (RVS) a valores indetectables de ARN del VHC (<50 IU/mL) a las 24 semanas después del final del

tratamiento[242]. No respondedor (NR) al tratamiento fue definido como un paciente con ARN del VHC detectable en plasma al final del tratamiento o las 24 semanas después del final del tratamiento.

5.2. Datos clínicos y de laboratorio.

En el día de la biopsia, se obtuvo la siguiente información de las historias clínicas: edad, sexo, categoría de riesgo, peso, talla, consumo de alcohol, categoría clínica del CDC, tratamiento antirretroviral previo y en el momento de la biopsia hepática, y tiempo total de terapia antirretroviral.

5.3. Técnicas de laboratorio.

5.3.1. Procesamiento de las muestras.

Las muestras de sangre utilizadas en el estudio se obtuvieron por venopunción de los pacientes en tubo de vidrio con anticoagulante EDTA (VACUTAINER®) para la obtención de plasma y se mantuvieron a temperatura ambiente. Las muestras se procesaron durante la primera hora siguiente a la extracción.

El tubo de EDTA se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos e inmediatamente se alicuotó y congeló el plasma a -70°C hasta la cuantificación de mediadores inmunológicos. El tubo de EDTA de controles sanos se conservó de manera similar.

5.3.2. Diagnóstico y seguimiento de la infección viral.

El diagnóstico de la infección por el VIH y el VHC fue recogido de las historias clínicas. En los dos casos, la estrategia de diagnóstico es muy similar. A continuación se explica cada uno de los procesos siguiendo una estrategia distinta en niños y en adultos.

En niños, el diagnóstico de infección por el VIH y/o VHC se dificulta por el traspaso pasivo de anticuerpos maternos, los que están presentes en todos los hijos de madre infectadas por el VIH durante los primeros 12 a 18 meses de vida, por lo que su presencia a esta edad se debe interpretar como exposición al virus y no necesariamente como infección. El diagnóstico de infección en niños hijos de madre infectada por el VIH y/o VHC, exige demostrar la presencia del virus mediante la identificación de su material genético por PCR o la detección de antígenos del virus mediante inmunoensayo.

En adultos, se emplean métodos indirectos poniendo de manifiesto la respuesta serológica frente a diferentes proteínas del virus y pruebas confirmatorias por inmunotransferencia (Western-Blot).

5.3.3. Tests de la infección por el VIH.

5.3.3.1. Diagnóstico de la infección por el VIH.

5.3.3.1.1. Detección de anticuerpos anti-VIH.

La presencia de anticuerpos frente al VIH se realiza por ELISA (Abbott HIVAB HIV-1 EIA; Abbott GmbH, Wiesbaden- Delkenheim, Germany) y posteriormente la prueba confirmatoria mediante inmunotransferencia (Western-Blot) que se realizó mediante un equipo comercial (New Lav Blot I, Sanofi Pasteur) [243].

5.3.3.1.2. Detección del ADN proviral del VIH por PCR.

El DNA de las células, se extrajo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) utilizando un ensayo comercial (Wizard TM Genomic DNA Purification KIT, Promega) mediante lisis y precipitación de proteínas, posteriormente se precipitó el DNA con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Se resuspendió en solución de rehidratación (TE). Posteriormente, se analizó la presencia de DNA del VIH en las CMSP del paciente utilizando una doble PCR con tres diferentes grupos de oligonucleótidos para las regiones de *gag*, *pol*, *env* (JA4 a JA7, JA17-JA20 y JA13 a JA16) del genoma viral. La detección de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (NuSieve 3:1) y tinción con bromuro de etidio. Las células 8E5 se utilizaron como control positivo. Todos los procedimientos de preparación de las muestras y amplificación incluyeron las medidas convencionales recomendadas para evitar la contaminación de las muestras y de los reactivos con productos amplificados por PCR o controles positivos [243].

5.3.3.2. Marcadores de seguimiento de la infección por el VIH.

5.3.3.2.1. Carga viral plasmática del VIH.

La carga viral ha sido recogida de las historias clínicas. Los valores de ARN-VIH se determinaron en plasma por RT-PCR usando un ensayo comercial específico para VIH en un analizador tipo Cobas Amplicor (Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, EE.UU.), aprobado por la FDA para monitorización de la carga viral de este virus.

5.3.3.2.2. Cuantificación de linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+ en sangre total por citometría de flujo.

Los valores de linfocitos T CD4+ y CD8+ han sido recogidos de las historias clínicas. Las células T en sangre periférica fueron cuantificadas por inmunofluorescencia directa, usando anticuerpos monoclonales de la serie T. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACScan (Becton-Dickinson, San José C.A., EE.UU.) usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson, San José C.A., EE.UU.) dentro de las dos horas siguientes a la tinción de las células.

5.3.4. Tests de la infección por el VHC.

5.3.4.1. Diagnóstico de la infección por el VHC.

5.3.4.1.1. Detección de anticuerpos anti –VHC.

Se utilizó la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) que detecta los anticuerpos contra los antígenos recombinantes c100-3, c200, c22-3 y c33c del virus de la hepatitis C (Ortho HCV 2.0 ELISA test System. Ortho Diagnostic System Inc., Raritan, New Jersey, USA). Su aparición se retrasa entre 4 y 6 semanas. Durante este período de "ventana serológica", la detección de anti-VHC será negativa, por lo que la negatividad de esta prueba en una muestra única no descarta la infección. Además, en pacientes con una respuesta humoral deficiente (VIH, etc.) y en pacientes en hemodiálisis, la negatividad para anti-VHC no excluye totalmente la infección.

Mediante técnicas de inmunotransferencia (Western-Blot) se realizan las pruebas confirmatorias (Deciscan® HCV Plus assay. Biorad, Marne-La-Coquette, France). Se realizan sobre un soporte de nitrocelulosa o nylon al que se han adherido péptidos antigénicos en diferentes lugares (bandas) derivados de la región *core*, región hipervariable y regiones no estructurales NS3, NS4 y NS5.

5.3.4.2. Determinación del antígeno del core del VHC

Para la determinación del antígeno del *core* se utilizan métodos de enzimoimmunoanálisis (test Elisa HCV Ag-Ab ULTRA (BioRad, Marnes la Coquette, France) con anticuerpos monoclonales. Éstos permiten detectar y cuantificar la viremia a través de la detección y cuantificación de este antígeno permitiendo la identificación temprana de la infección por el VHC.

5.3.4.3. Marcadores de seguimiento de la infección por el VHC.

5.3.4.3.1. Determinación de la carga viral del VHC

La carga viral ha sido recogida de las historias clínicas. Los valores de ARN-VHC se determinaron en plasma por RT-PCR usando un ensayo comercial específico para VHC en un analizador tipo Cobas TaqMan (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test. Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, EE.UU.). Su positividad indica presencia de virus circulante y confirma infección en curso, aguda o crónica.

5.3.4.3.2. Determinación del genotipo viral

El genotipo del VHC se determinó mediante hibridación de biotina marcada con productos de PCR para sondas de oligonucleótidos unidos a membrana de nitrocelulosa (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, Ghent, Belgium). Estas pruebas pueden llegar a permitir la discriminación entre los diferentes subtipos.

5.3.5. Biopsia hepática.

El diagnóstico de fibrosis y grado de activación del hígado ha sido recogido de las historias clínicas. Las biopsias hepáticas se realizaron en pacientes que eran candidatos potenciales para la terapia frente al VHC y que no recibieron tratamiento anterior con interferón siguiendo las recomendaciones de la Comisión de Atención al Paciente de la Asociación Americana de Gastroenterología [244]. Todas las biopsias hepáticas fueron realizadas con una aguja de aspiración (HISTO-CUT 16G, Sterylab Srl. Milano, Italia). No se registró sistemáticamente el tamaño de las muestras de biopsia hepática, sin embargo, durante el período de estudio, 5 de 297 biopsias presentaron insuficiente tejido hepático para el diagnóstico patológico.

Los cilindros de tejido hepático se fijaron con formalina, se incluyeron en parafina y fueron teñidas con hematoxilina-eosina, tricómico de Mason, y Perls de hierro. Las muestras fueron analizadas por un patólogo (Dr. Emilio Álvarez) que no tenía conocimiento de los aspectos clínicos o de laboratorio de los pacientes. El estadio de fibrosis hepática y el grado de actividad se calcularon siguiendo los criterios establecidos por el *METAVIR Cooperative Study Group* [174]: a) La fibrosis hepática se clasificó como: F0, no fibrosis; F1, fibrosis portal; F2, fibrosis periportal; F3, fibrosis en puentes; y F4, cirrosis definida. b) El grado de actividad se clasificó de la siguiente manera: A0, ninguna actividad; A1, lesión o actividad leve; A2, actividad moderada; y A3, actividad marcada y/o puente o necrosis multiacinar marcada.

Los investigadores realizaron la evaluación de las biopsias, interpretación de los datos clínicos, o el cálculo y el análisis de las normas de referencia sin el conocimiento de los resultados de las otras evaluaciones (evaluación ciega).

5.3.6. Análisis bioquímicos y hematológicos.

Los datos hematológicos y bioquímicos fueron extraídos de las historias clínicas. Las variables hematológicas fueron determinadas en un analizador automático tipo Sysmex XE2100 Hematology Analyzers (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Las variables bioquímicas fueron determinadas en un analizador automático tipo Hitachi 912 (Boehringer Mannheim, Germany).

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una extracción de sangre para un análisis hematológico y bioquímica elemental (**tabla 6**).

Tabla 6 . Datos de laboratorio solicitados y analizados.

Bioquímica
• Glucosa
• Insulina
• AST
• ALT
• ALP
• GGT
• Colesterol
• Triglicéridos
• Albumina
Hematología
• Hemograma
• VSG
• Plaquetas
• TP
• INR
• Fibrinógeno

En cada paciente, el grado de resistencia a la insulina (RI) fue calculado por el método del modelo de evaluación homeostático (the homeostatic model assessment method, HOMA), descrito por Matthews [245]. En particular, la resistencia a la insulina (HOMA-RI) se obtuvo de muestras adquiridas de los pacientes en ayunas mediante la fórmula: glucosa en plasma (mmol/L) por la insulina en plasma (miliunits por litro, mU/L), dividido por 22,5. Un valor de

HOMA mayor o igual a 3.8 indica que el paciente presenta RI. Si el valor es inferior a 3.8 no hay RI [246].

5.3.7. Inmunoensayo.

5.3.7.1. Elisa multiplex en el analizador Luminex 100 TM

Los marcadores se midieron en una muestra de plasma y para algunos de estos marcadores se utilizó el ELISA multiplex de LINCOplexTM con el analizador Luminex 100 TM (Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos) según las especificaciones del fabricante, para su evaluación (**Figura 1**).

Figura 1. Analizador Luminex 100 TM.



Se emplearon kits Multiplex de dos fabricantes distintos:

a) LINCOplexTM (LINCO Research, St. Charles, MO 63304, USA), el cual fue usado para medir específicamente: insulina, leptina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), ligando Fas soluble (sFasL), factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), molécula soluble de adhesión intercelular (sICAM), y molécula soluble de adhesión vascular (sVCAM).

b) Procarta® Immunoassays (Panomics Afymetrix, Inc., Fremont, California, Estados Unidos), el cual fue usado para medir específicamente: *proteína 10 inducida por-interferon* ó IP-10 (CXCL-10), eotaxina (CCL-11), proteína quimiotáctica de monocitos-1 ó MCP-1 (CCL-2), proteína quimiotáctica de monocitos-3 ó MCP-3 (CCL-7), oncogén relacionado con el crecimiento tumoral

ó Gro- α (CXCL-1), y la proteína activadora de neutrófilos derivada del epitelio ó ENA-78 (CXCL-5).

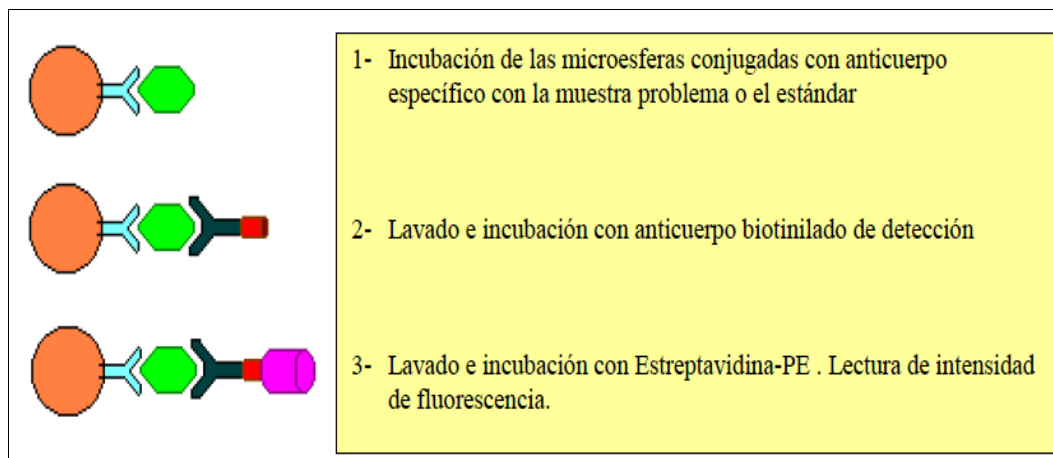
Se obtuvo un mínimo de 100 eventos (*beads*) para cada muestra de proteína, obteniéndose valores de intensidad media de fluorescencia. Las concentraciones analíticas de proteína se calcularon a partir de una curva estándar utilizando MasterPlex™ QT Analysis versión 2 (MiraiBio, Inc., Alameda, CA) utilizando una fórmula de regresión con cinco parámetros.

El principio de este análisis es similar a un inmunoensayo tipo sandwich. Los anticuerpos dirigidos contra las citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento diana están unidos covalentemente a microesferas teñidas internamente. Las microesferas reaccionan con las biomoléculas diana que estén presentes en la muestra.

Protocolo:

- 1) Estándares: se prepararon los estándares realizando diluciones seriadas (1/4) de un estándar suministrado con el kit resultando 8 estándares que se analizaron por duplicado. Como control negativo se utilizó diluyente del estándar.
- 2) Muestras: para la preparación de las muestras, se realizaron diluciones 1/4.
- 3) Se procedió a humectar la placa con la adición de tampón y eliminación de dicho tampón mediante filtración por vacío. En la placa ya preparada, se adicionaron, en primer lugar, las microesferas que llevaban incorporado el anticuerpo dirigido frente a las diferentes citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento.
- 4) Se realizaron dos lavados de los micropocillos y seguidamente, se añadieron los estándares, controles y muestras en el pocillo correspondiente y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos.
- 5) Después de la incubación de las muestras, se realizaron 3 lavados y se añadió el anticuerpo de detección (marcado con biotina) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Esto resulta en la formación de un sandwich de anticuerpos alrededor de la citocina, quimiocina o factores de crecimiento diana.
- 6) Tras 3 lavados, se adicionó la solución de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 10 minutos. El SAPE se une al anticuerpo de detección biotinilado en la superficie de la microesfera (**Figura 2**). Posteriormente, se realizaron una serie de lavados antes de la detección.

Figura 2. Representación gráfica del método utilizado para la detección multiplex de mediadores inmunológicos.

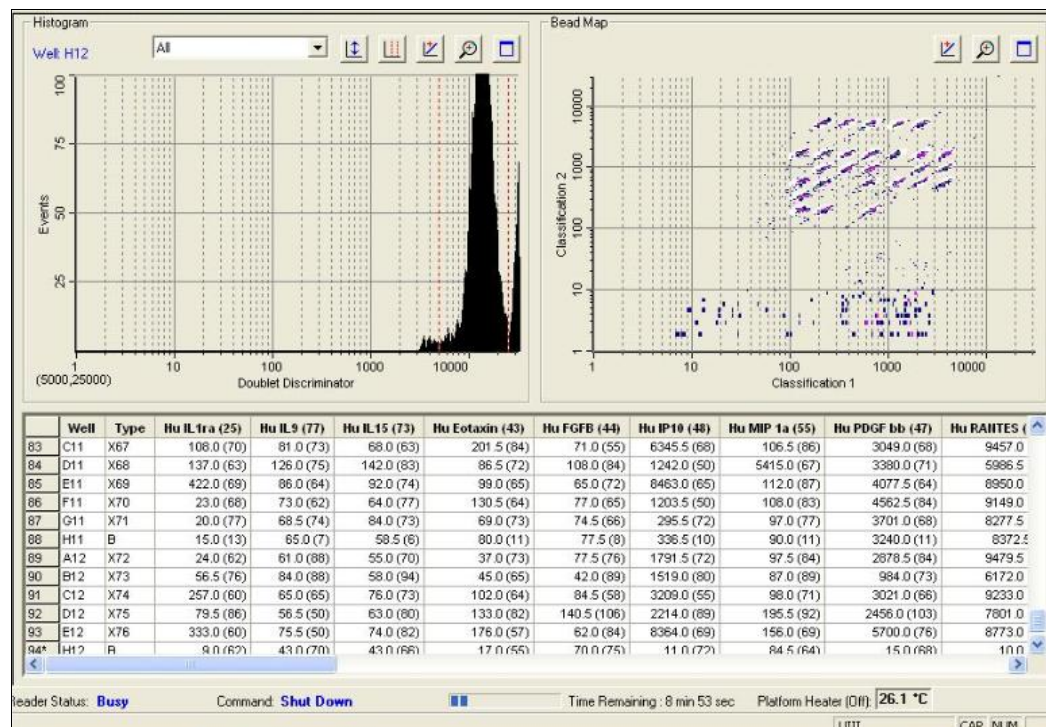


Los datos de la reacción se adquirieron usando el sistema Luminex® (Austin, TX, EEUU) (**Figura 1**) que es un instrumento basado en citometría de flujo que permite cuantificar la intensidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la superficie de las microesferas. Lleva incorporados dos láseres y un sistema óptico para la detección de dichas reacciones.

Además, incluye un sistema informático de captura, procesamiento y transformación de la señal fluorescente en señal digital, permitiendo así el análisis de los resultados. Uno de los láseres emite una radiación con una longitud de onda capaz de excitar las moléculas de fluorocromo contenidas en las microesferas. La intensidad de la fluorescencia emitida por éstas permite diferenciar el analito que se mide en cada caso (fluorescencia interna de las microesferas). El otro láser excita las moléculas de ficoeritrina (PE) que se añaden al final del ensayo (fluorescencia en la superficie de las microesferas). El sistema óptico de detección del Luminex® permite revelar la intensidad de la reacción que tiene lugar en la superficie de las microesferas y el software del Luminex® calcula automáticamente la concentración de cada citocina en la muestra problema, empleando una curva estándar derivada de una suspensión de citocinas estándar, de concentración conocida y de la que se hacen diluciones seriadas (**Figura 3**).

Para una adecuada adquisición de los datos, las microesferas están teñidas con una combinación de dos colorantes fluorescentes en proporciones conocidas de manera que cada microesfera tiene asignado un número (región de la microesfera) del 1 al 100 según el ratio de los dos colorantes fluorescentes. Los valores del último estándar fueron considerados como límites de detección para cada mediador, tal y como recomienda el fabricante. Aquellos valores por debajo del nivel de detección se equipararon al nivel de detección.

Figura 3. Pantalla del programa donde se recogen en una tabla los valores de cada citocina y en los gráficos las regiones en que se distribuyen las microesferas así como la intensidad luminosa que emite la muestra.



5.3.7.2. Elisa simple.

En el caso de las moléculas para las que no se dispuso de un ensayo multiplex viable, se realizaron inmunoensayo sencillos mediante el uso de kits ELISA cuantitativos disponibles comercialmente para:

a) El ácido hialurónico ó AH (HA ELISA/EIA Kit; Echelon Biosciences Inc., de Salt Lake City, Utah, EE.UU.). La medición se basa en un ensayo de ELISA competitivo en el que la absorción es inversamente proporcional a la concentración de HA en las muestras.

b) Angiopoietina-II ó Ang-2 (Human Angiopoietin-2 Quantikine ELISA Kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). La medición se basa en un ensayo de ELISA tipo sándwich en el que un anticuerpo monoclonal específico para Ang-2 ha sido pre-revestido sobre una microplaca.

c) Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), metaloproteinasa-1 de la matriz (MMP-1), metaloproteinasa-2 de la matriz (MMP-2) con los kits Biotrak® (Amersham Biosciences, Bucks, Reino Unido UK). La medición se basa en un ensayo de ELISA tipo sándwich.

d) YKL - 40 (Metra YKL-40, Quidel Corporation, San Diego, San Diego, CA, EE.UU.). La medición se basa en un ensayo de ELISA tipo sándwich.

5.3.8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Todos los p-valores en los test estadísticos utilizados fueron de dos colas. La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

5.3.8.1. Test Ji cuadrado(x2) de Pearson.

Utilizada para analizar variables cualitativas o categóricas comparando proporciones (o porcentajes). Se aplica siempre que se deseen analizar datos agrupados en categorías y se presenten como frecuencias con las que se da cada categoría.

$$\chi^2 = \sum \left(\frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}} \right)$$

La prueba ji-cuadrado de Pearson indica si hay diferencias entre las distintas categorías. El test exacto de Fisher es una variante de la prueba ji-cuadrado de Pearson para tablas 2x2. Es una alternativa cuando el tamaño muestral es pequeño. Recomendable para comparar proporciones. Se ha de aplicar siempre que haya una celda con valor esperado menor de 5. También se puede aplicar si todos los valores esperados son superiores a 5.

5.3.8.2. Pruebas estadísticas para comparar dos o más grupos.

5.3.8.2.1. Pruebas paramétricas.

Las pruebas paramétricas exigen el cumplimiento de una serie de condiciones para poder ser aplicada: la variable ha de seguir una distribución normal en los grupos estudiados y las varianzas han de ser homogéneas entre los grupos. La normalidad de cada una de las variables se comprobó previamente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; la homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante la prueba de Levene. Todas las pruebas fueron de dos colas con los valores $P < 0,05$ considerada significativa.

Para comparar dos o más grupos independientes: T-student y ANOVA.

Para comparar dos o más grupos dependientes: T-student y ANOVA para medidas repetidas.

5.3.8.2.2. Pruebas no paramétricas.

Las pruebas estadísticas no paramétricas se usaron cuando la muestra fue pequeña o la distribución de los datos en la población fue libre (los datos no procedían de poblaciones normales y con igualdad de varianzas).

Para comparar dos grupos independientes: Test de U- Mann Withney.

Para comparar dos grupos dependientes: Test de Wilcoxon de medidas repetidas.

5.3.8.3. Coeficiente de correlación.

Este coeficiente permite estudiar la fuerza de asociación entre dos variables. Dicha fuerza será nula (asociación inexistente) si $r=0$, aumentando a medida que el valor de r se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente r indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo, e inversa cuando es negativo.

Para el análisis de dos variables cuantitativas se calcula el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r). Cuando las dos variables cuantitativas no se ajustan a la distribución normal se calcula en coeficiente de correlación Spearman que es una variante no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson.

5.3.8.4. Regresión.

Cuando se desea estudiar la relación entre dos variables y además una de ellas puede considerarse como variable dependiente o “respuesta” se utilizaron las técnicas de regresión. Con la regresión, aparte de medir el grado de asociación entre las dos variables, podremos realizar predicciones de la variable dependiente.

5.3.8.4.1. Regresión logística.

Cuando la variable dependiente o “respuesta” es dicotómica se utiliza la regresión logística. Con la regresión logística se obtiene valores de “odds ratio” (OR) que es una medida de riesgo o asociación equivalente al riesgo relativo. Para poder interpretar un OR es necesario siempre tener en cuenta cuál es el factor o variable predictiva que se estudia y cuál es el resultado o desenlace. El OR no tiene interpretación absoluta, siempre es relativa. El valor nulo para la OR es el 1. Una OR = 1 implica que las dos categorías comparadas son iguales. El valor mínimo posible es 0 y el máximo teóricamente posible es infinito. Una OR de 3 se interpreta como una ventaja 3 veces superior de una de las categorías relativamente a la otra categoría (categoría de referencia) para alcanzar el desenlace o resultado (éxito terapéutico). Una OR inferior a la unidad se interpreta como que el desenlace es menos frecuente en la categoría o grupo que se ha elegido como de interés con respecto al otro grupo o categoría de referencia.

5.3.8.4.2. Regresión múltiple.

La mayoría de los estudios clínicos conllevan la obtención de datos en un número más o menos extenso de variables. En algunos casos el análisis de dicha información se lleva a cabo centrando la atención en pequeños subconjuntos de las variables recogidas utilizando para ello análisis sencillos que involucran únicamente técnicas bivariadas. Un análisis apropiado, sin embargo, debe tener en consideración toda la información recogida o de interés para el clínico y requiere de técnicas estadísticas multivariantes más complejas. En la mayoría de los casos lo que se pretende es predecir una respuesta en función de un conjunto más amplio de variables, siendo necesario considerar el modelo de regresión lineal múltiple como una extensión de la recta de regresión que permite la inclusión de un número mayor de variables.

5.3.8.5. Rendimiento de una prueba diagnóstica.

5.3.8.5.1. Curvas ROC

Se calcularon las curvas ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) para establecer la fiabilidad de la prueba diagnóstica, a través de la especificidad y sensibilidad de la misma, así como el área bajo la curva y su correspondiente intervalo de confianza al 95% y la significación estadística de ese área.

El análisis del área bajo la curva ROC, es el método que actualmente se considera una herramienta fundamental y unificadora en todo proceso de evaluación de la precisión de pruebas diagnósticas.

Cuando los valores de la prueba se miden en una escala continua, los índices de sensibilidad y especificidad dependen del sitio en que se establece la línea divisoria entre positivo y negativo. Depende de que busquemos mayor sensibilidad o especificidad de la prueba para elegir un punto de corte donde preferimos tener más falsos positivos que ignorar a una persona enferma.

Las curvas ROC se representan en unos ejes donde las abscisas representan la tasa de falsos positivos y las ordenadas los positivos verdaderos. El resultado se determina según el área bajo la curva y comparándola con una línea que representa el estado de indiferencia. Dicho de otra forma, esa línea representa la situación de una prueba cuyo resultado, ya sea positivo o negativo, no modifica la probabilidad de estar enfermo o no.

Una curva ROC, cuanto más alejada se encuentre de esa línea, más válida es, debido a que la tasa de verdaderos positivos se aproxima a uno y la tasa de falsos positivos se acerca a cero.

5.3.8.5.2. Valores predictivos

Los valores predictivos (positivo y negativo) miden la eficacia real de una prueba diagnóstica. Son probabilidades del resultado, es decir, dan la probabilidad de padecer o no una enfermedad una vez conocido el resultado de la prueba diagnóstica. Se trata de valores post-test y dependen de la prevalencia de una enfermedad, es decir, del porcentaje de una población que está afectada por esa determinada patología.

Publicaciones

6. Publicaciones

6.1. Can serum hyaluronic acid replace simple non-invasive indexes to predict liver fibrosis in HIV/Hepatitis C coinfecting patients?

Resino S, Bellón JM, Asensio C, Micheloud D, Miralles P, **Vargas A**, Catalán P, López JC, Alvarez E, Cosin J, Lorente R, Muñoz-Fernández MA, Berenguer J. Can serum hyaluronic acid replace simple non-invasive indexes to predict liver fibrosis in HIV/Hepatitis C coinfecting patients?. BMC Infect Dis. 2010 Aug 19;10:244.

Antecedentes: El ácido hialurónico (HA), un componente esencial de la matriz extracelular del hígado, es producido por las células estrelladas hepáticas y degradado por las células del endotelio sinusoidal. Los niveles de HA aumentan con el desarrollo de la fibrosis del hígado en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (VHC). Evaluamos en suero el HA para predecir la fibrosis avanzada ($F \geq 3$) y la cirrosis ($F4$) en pacientes coinfectados por el VIH /VHC.

Diseño del estudio: Transversal.

Pacientes: Se estudiaron 201 pacientes coinfectados por el VIH/VHC sin tratamiento con interferón, con biopsia hepática realizada y con la determinación del HA en suero.

Métodos: La fibrosis del hígado fue evaluada sobre la biopsia hepática y según la escala METAVIR. El HA fue determinado por ELISA. Se evaluó el rendimiento diagnóstico del HA con el área bajo la curva ROC (AUROC), la sensibilidad (SE), la especificidad (SP), el valor predictivo positivo (PPV), y valor predictivo negativo (NPV) en 2 puntos de corte (95 % de Se (punto de corte bajo) y 95 % Sp (punto de corte alto)) para evaluar exactitud de diagnóstico.

Resultados: La distribución de la fibrosis hepática en nuestra cohorte fue de 58,2% con fibrosis significativa ($F \geq 2$), el 31,8% con fibrosis avanzada ($F \geq 3$), y el 11,4% con cirrosis ($F4$). Los valores para el AUROC de los niveles de HA que corresponden a fibrosis significativa ($F \geq 2$), fibrosis avanzada ($F \geq 3$) y la cirrosis ($F4$) fueron 0,676, 0,772, y 0,863, respectivamente. Los valores de AUROC para HA fueron similares a los de HGM-1, HGM-2, FIB-4, APRI, y el índice de Forns. La mayor exactitud diagnóstica del HA se encontró para el diagnóstico de la cirrosis ($F4$). Con el punto de corte bajo (1182 ng/mL) para descartar cirrosis se obtuvo un valor predictivo negativo del 99% y con el punto de corte alto (2400 ng/ml) para confirmar cirrosis ($F4$) se obtuvo un valor predictivo positivo de 55%. Mediante la utilización de estos puntos bajo y alto corte para la cirrosis, las biopsias teóricamente podría haber sido evitada en 52,2% (111/201) de los pacientes.

Conclusión: La precisión diagnóstica de los niveles séricos de HA aumenta gradualmente con el estadio de fibrosis hepática. Sin embargo, el HA es mejor que otros índices no invasivos que utilizan parámetros fácilmente disponibles en la práctica clínica sólo para el diagnóstico de cirrosis.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Can serum hyaluronic acid replace simple non-invasive indexes to predict liver fibrosis in HIV/Hepatitis C coinfecting patients?

Salvador Resino^{1*}, José M Bellón², Cristina Asensio³, Dariela Micheloud^{1,4}, Pilar Miralles⁵, Ana Vargas¹, Pilar Catalán⁶, Juan C López⁵, Emilio Álvarez⁷, Jaime Cosin⁵, Raquel Lorente⁸, María A Muñoz-Fernández^{6,8}, Juan Berenguer⁵

Abstract

Background: Hyaluronic acid (HA) serum levels correlate with the histological stages of liver fibrosis in hepatitis C virus (HCV) mono-infected patients, and HA alone has shown very good diagnostic accuracy as a non-invasive assessment of fibrosis and cirrhosis. The aim of this study was to evaluate serum HA levels as a simple non-invasive diagnostic test to predict hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfecting patients and to compare its diagnostic performance with other previously published simple non-invasive indexes consisting of routine parameters (HGM-1, HGM-2, Forns, APRI, and FIB-4).

Methods: We carried out a cross-sectional study on 201 patients who all underwent liver biopsies and had not previously received interferon therapy. Liver fibrosis was determined via METAVIR score. The diagnostic accuracy of HA was assessed by area under the receiver operating characteristic curves (AUROCs).

Results: The distribution of liver fibrosis in our cohort was 58.2% with significant fibrosis ($F \geq 2$), 31.8% with advanced fibrosis ($F \geq 3$), and 11.4% with cirrhosis (F4). Values for the AUROC of HA levels corresponding to significant fibrosis ($F \geq 2$), advanced fibrosis ($F \geq 3$) and cirrhosis (F4) were 0.676, 0.772, and 0.863, respectively. The AUROC values for HA were similar to those for HGM-1, HGM-2, FIB-4, APRI, and Forns indexes. The best diagnostic accuracy of HA was found for the diagnosis of cirrhosis (F4): the value of HA at the low cut-off (1182 ng/mL) excluded cirrhosis (F4) with a negative predictive value of 99% and at the high cut-off (2400 ng/mL) confirmed cirrhosis (F4) with a positive predictive value of 55%. By utilizing these low and high cut-off points for cirrhosis, biopsies could have theoretically been avoided in 52.2% (111/201) of the patients.

Conclusions: The diagnostic accuracy of serum HA levels increases gradually with the hepatic fibrosis stage. However, HA is better than other simple non-invasive indexes using parameters easily available in routine clinical practice only for the diagnosing of cirrhosis.

Background

Human immunodeficiency virus (HIV) infection influences the natural evolution of chronic hepatitis C (CHC) infection by accelerating fibrosis progression and increasing the rate of cirrhosis and end-stage liver disease in HIV/hepatitis C virus (HCV) coinfecting patients [1,2]. Despite a decline in morbidity/mortality from opportunistic infections since the introduction of highly

active antiretroviral therapy (HAART), end-stage liver disease continues to be a frequent cause of hospitalization and death in patients coinfecting with HIV and HCV [3,4].

Staging liver fibrosis is considered to be an essential part in the management of patients with CHC, because it provides prognostic information and, in many cases, assists in therapeutic decisions. For many years, the diagnosis and quantification of fibrosis have relied on liver biopsies, a procedure with several drawbacks (bleeding in the liver and around the site of the procedure, pain around the biopsy area, infection, damage to

* Correspondence: sresino@isciii.es

¹Laboratory of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

liver tissue, etc.) [5]. Currently, there are several non-invasive diagnostic methods for determining liver fibrosis that are being validated, such as blood markers and imaging methods [6].

One of these blood markers is hyaluronic acid (HA), an essential component of the extracellular matrix in virtually every tissue of the body. In the liver, HA is mostly synthesized by hepatic stellate cells and degraded by sinusoidal endothelial cells [7]. HA serum levels have been found to correlate with the histological stages of liver fibrosis in HCV monoinfected patients [8], and HA alone has shown very good diagnostic accuracy for the non-invasive assessment of fibrosis and cirrhosis [9,10].

The purpose of our study was to evaluate serum HA levels as a simple non-invasive diagnostic test to predict hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients and to compare its diagnostic performance with other previously published simple non-invasive indexes consisting of routine parameters.

Methods

Patients

We carried out a retrospective cross-sectional study of all patients with documented HIV/HCV coinfection who underwent a liver biopsy between May 2000 and May 2007 at the HIV outpatient clinic of the Hospital Gregorio Marañón in Madrid (Spain).

Liver biopsies were performed on patients who were potential candidates for interferon plus ribavirin therapy and had no prior HCV therapy. The inclusion criteria were: availability of a frozen serum sample collected on the day of liver biopsy; no clinical evidence of hepatic decompensation; detectable HCV RNA by polymerase chain reaction; negative for hepatitis B surface antigen; CD4+ lymphocyte count higher than 200 cells/ μ L; anti-retroviral therapy or no need for antiretroviral therapy; and absence of diabetes, active opportunistic infections, or active drug or alcohol addiction.

From our cohort of 361 patients with liver biopsy data, only 201 could be included because they had had a serum sample collected and frozen. The group of excluded patients had significant differences in the numbers of patients on antiretroviral therapy with NNRTI (included (104/201 patients (51.7%)) vs. excluded (57/160 patients (36.3%)), $p < 0.05$), advanced fibrosis diagnosis (included (41/201 patients (20.4%)) vs. excluded (18/160 patients (11.3%)), $p < 0.05$), undetectable plasma HIV viral load (included (156/201 patients (77.6%)) vs. excluded (90/160 patients (56.3%)), $p < 0.05$), plasma HCV RNA > 850,000 copies/ml (included (125/201 patients (75.8%)) vs. excluded (95/160 patients (63.3%)), $p < 0.05$), and plasma AST levels (included (57 IU/L) vs. excluded (65.5 IU/L), $p < 0.05$).

All work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave their written informed consent for the liver biopsies, and the Institutional Ethics Committee approved the study.

Clinical and Laboratory data

Immediately prior to the liver biopsy, a fasting blood sample was taken from the patient to analyze complete blood counts, liver panel, basic metabolic panel, coagulation tests, HIV viral load, and CD4+ counts. The duration of HCV infection for all patients with a history of intravenous drug use was estimated from the first year needles were shared, and the others patients were considered to have an "unknown" HCV infection duration. Also, a serum sample was immediately frozen (-70°C) and stored for further assays.

HIV and HCV infection were documented in all patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). The HCV viral load was measured by PCR (Cobas Amplicor HCV Monitor Test, Branchburg, NJ, USA). HCV genotype was determined by hybridization of biotin-labeled PCR products to oligonucleotide probes bound to nitrocellulose membrane strips (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, Ghent, Belgium). HA was tested in serum samples by a commercially available quantitative ELISA (HA-ELISA; Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA). Concentrations were assayed in duplicate.

For purposes of comparison with HA, we evaluated 5 reported simple models consisting of routine parameters to predict liver fibrosis: Forns [11], APRI [12], FIB-4 [13], HGM-1 and HGM-2 indexes [14] (Table 1).

Liver biopsy and histology

Liver biopsies were performed on an outpatient basis following the recommendations of the Patient Care Committee of the American Gastroenterological Association [15]. All liver biopsies were performed by the same physicians (J.B. and P.M.) with a suction needle (HISTO-CUT 16G, Sterylab Srl. Milano, Italy). Ultrasound was routinely used to determine the percutaneous biopsy site. We did not systematically record the size of liver biopsy specimens, however, during the study period, only 5 out of 297 biopsies yielded insufficient liver tissue for pathological diagnosis.

The liver tissue sections were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained by hematoxylin-eosin, Mason's trichrome, and Perls' iron. The samples were evaluated by a single pathologist (E.A.). Liver fibrosis was estimated prospectively following the criteria established by the META-VIR Cooperative Study Group [16]. Fibrosis was scored as follows: F0, no fibrosis; F1, portal fibrosis; F2 periportal fibrosis or rare portal-portal septa; F3, fibrous septa with

Table 1 Simple non-invasive models for liver fibrosis consisting of routine parameters

Index	Mathematical formula	Reference
Forns	$7.811 - 3.131 * \ln(\text{Platelet count } (10^9/\text{L}) + 0.781 * \ln(\text{GGT}) + 3.467 * \ln(\text{Age}) - 0.014 * \text{cholesterol}$	[11]
APRI	$\frac{100 * (\frac{\text{AST}(\text{IU/L})}{40})}{\text{Platelet count}(10^9/\text{L})}$	[12]
FIB-4	$\frac{\text{Age}(\text{years}) * \text{AST}(\text{IU/L})}{\text{Platelet count}(10^9/\text{L}) * \sqrt{\text{ALT}(\text{IU/L})}}$	[13]
HGM-1	$\frac{1}{1 + e^{(1.971 + 0.012 * \text{Platelet count}(10^9/\text{L}) - 0.026 * \text{AST}(\text{IU/L}) - 0.033 * \text{glucose}(\text{mg/dL}))}}$	[14]
HGM-2	$\frac{1}{1 + e^{(6.175 - 0.010 \text{ALP}(\text{IU/L}) - 4.8 * \text{INR} + 0.010 * \text{Platelet count}(10^9/\text{L}) - 0.007 * \text{AST}(\text{IU/L}))}}$	[14]

Abbreviations: LN, logarithm neperian; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; INR, international normalized ratio; ALP, alkaline phosphatase.

architectural distortion but with no obvious cirrhosis (bridging fibrosis); and F4, definite cirrhosis. The researchers in charge of evaluating the biopsies, interpreting the clinical data, or calculating and analyzing the reference standard had no prior knowledge of results.

Statistical analysis

Overall, results are presented as medians (25th percentile, 75th percentile) for continuous variables and as frequencies and percentages for categorical data. Comparisons between HA levels and fibrosis stage were analyzed using the Mann-Whitney U-test. All tests were two-tailed with a p-value ≤ 0.05 considered to be significant. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software (SPSS INC, Chicago, IL, USA) and STATA 9.1 (College Station, TX, USA).

We evaluated the diagnostic performance of all indexes using the receiver operating characteristic (ROC) curve constructed to study the absence and presence of significant fibrosis ($F \geq 2$), advanced fibrosis ($F \geq 3$), and cirrhosis (F4), and comparing the area under these ROC curves (AUC-ROCs) [17,18] with a nonparametric ROC analyses adjusted by Sidak's method for the effect of multiple comparisons.

For each fibrosis stage, we chose a low cut-off at 95% sensitivity (Se) used to predict the absence of the disease and a high cut-off at 95% specificity (Sp) used to predict the presence of the disease. Additional analyses of cut-offs that optimized both Se and Sp were also performed. The "optimal" cut-off was defined as the maximum of (Se + Sp). We calculated the Se, Sp, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for each cut-off point. We also calculated the diagnostic odds ratio (DOR) which expresses the strength of the association between test result and disease: it is the ratio

of the odds of a positive result in a person with the target condition compared to a person without the condition [19]. A DOR of 1 suggests the test providing no diagnostic evidence. Moreover, we also calculated the likelihood ratios (LR) which describe how many times a person with the target condition is more likely to have a particular test result than a person without that condition. LRs contribute to change the probability that a target condition is present after the test has been made. Binary tests have two LRs, positive and negative (LR+, LR-). A LR of 1 indicates no diagnostic value.

Finally, we calculated the percentage of patients in whom the results of the HA could have avoided the biopsy. For this purpose, we constructed three new 2×2 contingency tables combining the two cut-off points for comparing the results that were lower than the low cut-off (discarding significant fibrosis) and the results that were higher than the high cut-off point (for significant fibrosis, for advanced fibrosis, and for cirrhosis, respectively) with the corresponding biopsy results. From each table, patients correctly classified (true positive (TP) + true negatives (TN)) by the test would not have needed the biopsy procedure.

Results

Patients

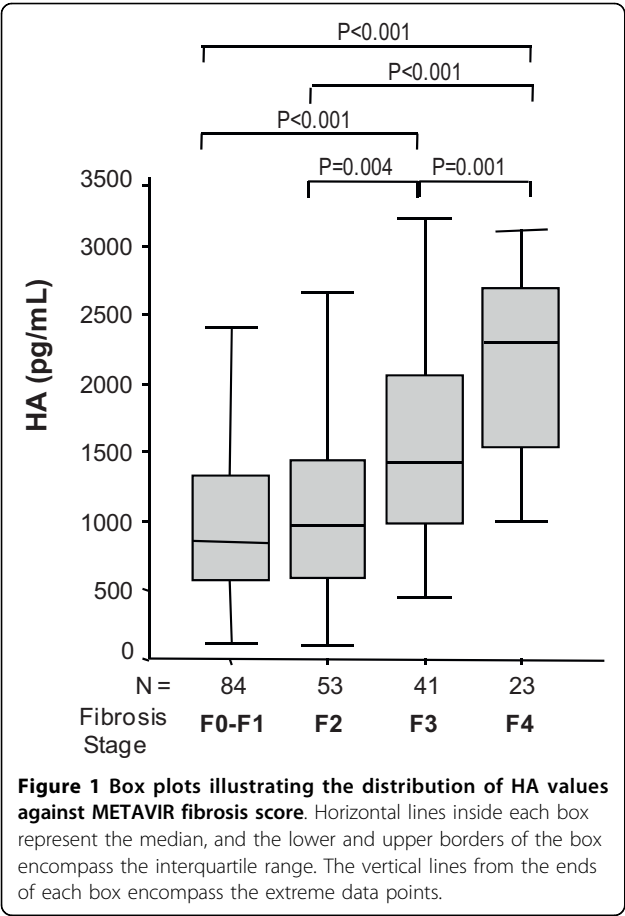
General characteristics of the 201 HIV/HCV-coinfected patients at the time of liver biopsy are shown in Table 2. Overall, 94.5% were on HAART: 23.4% with protease inhibitor based therapy, 51.7% with non-nucleoside analogue based therapy, 12.4% with 3 nucleoside analogue based therapy, and 7.5% with other drugs. The distribution of liver fibrosis in our cohort was 58.2% with significant fibrosis ($F \geq 2$), 31.8% with advanced fibrosis ($F \geq 3$), and 11.4% with cirrhosis (F4).

Table 2 Characteristics of the 201 HIV/HCV-coinfected patients, who underwent liver biopsies

Characteristic	Values
No. HIV-1 patients *	201
Sex (male) *	152 (75.6)
Age (years) [†]	39.4 (36.8; 43.3)
HIV acquired by IVDU *	180 (89.6)
Prior AIDS *	62 (30.8)
Years since HCV infection ^{†, ‡}	21.3 (17.7; 24.3)
High alcohol intake ^{*, §}	28 (14)
Antiretroviral therapy	
Non treated *	10 (5)
PI-based *	47 (23.4)
NNRTI-based *	104 (51.7)
3 NRTI-based *	25 (12.4)
Other *	15 (7.5)
Months on HAART (n = 190) [†]	50.2 (34.9; 65.7)
Stage of liver fibrosis *	
F0	16 (8)
F1	68 (33.8)
F2	53 (26.4)
F3	41 (20.4)
F4	23 (11.4)
Fibrosis progression index [†]	0.08 (0.05; 0.15)
HIV markers	
Nadir CD4+ T-cells [†]	210 (103; 324)
Baseline CD4+ T-cells/μL [†]	490 (373; 660)
HIV-RNA < 50 cp/mL *	156 (77.6)
Log10 VL copies/mL (n = 45)	3.23 (2.71; 3.98)
HCV markers *	
HCV genotype	
1 or 4	153 (77.3)
3	45 (22.7)
HCV-RNA >850,000 cp/ml	125 (75.8)
Hematologic parameters [†]	
Platelet count (× 10 ⁹ /L)	177 (140; 221)
Fibrinogen (mg/dL)	259 (228; 305)
INR	1 (1; 1.02)
Biochemical parameters [†]	
ALP (IU/L)	124 (81; 196)
AST (IU/L)	57 (37.5; 85)
GGT (IU/L)	113 (58; 208)
ALT (IU/L)	77 (49; 117)
AST/ALT	0.75 (0.6; 0.97)

*Absolute number (percentage). [†]Median (25th percentile; 75th percentile). [‡]The duration of HCV infection for patients with a history of intravenous drug use (IVDU) was calculated starting from the first year needles were shared. Duration of HCV infection was considered to be unknown for subjects infected through sexual contact. [§]Patients were questioned in relation to alcohol consumption. The consumption of > 50 gr. of alcohol per day for ≥12 months was considered as a high intake.

Abbreviations: HCV, Hepatitis C virus; HIV-1, Human immunodeficiency virus type 1; IVDU, intravenous drug users; HAART, highly active antiretroviral therapy; NRTI, nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; HIV-RNA, HIV plasma viral load; HCV-RNA, HCV plasma viral load; INR, international normalized ratio; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; ALT, alanine aminotransferase.



Diagnostic performance

HA levels increased significantly with the stage of hepatic fibrosis (Figure 1A). The highest values of HA were found in cirrhotic patients. The AUC-ROC values of the HA for significant fibrosis ($F \geq 2$), advanced fibrosis ($F \geq 3$) and cirrhosis (F4) were similar to those of the Forns, APRI, FIB-4, HGM-1 and HGM-2 indexes (Figure 2B).

Evaluation of cut-off points

For significant fibrosis ($F \geq 2$), using a low cut-off of 430 ng/mL HA, 13 of 84 (15.5%) patients with $F < 2$ were correctly identified, and only 6 of 117 (5.1%) patients with $F \geq 2$ were misclassified (61.0% PPV and 68.4% NPV). With a high cut-off of 1800 ng/mL, 36 of 117 (30.8%) patients with $F \geq 2$ were correctly identified, and only 4 of 84 (4.8%) of patients with $F < 2$ were misclassified (90% PPV and 49.7% NPV) (Table 3). Considering these low and high cut-off points, biopsies could have been avoided in 24.4% (49/201) of patients by using HA instead. When we applied an optimal cut-off of 1250 ng/mL, 128 patients were correctly identified (67 patients were TP and 61 patients were TN), and 83

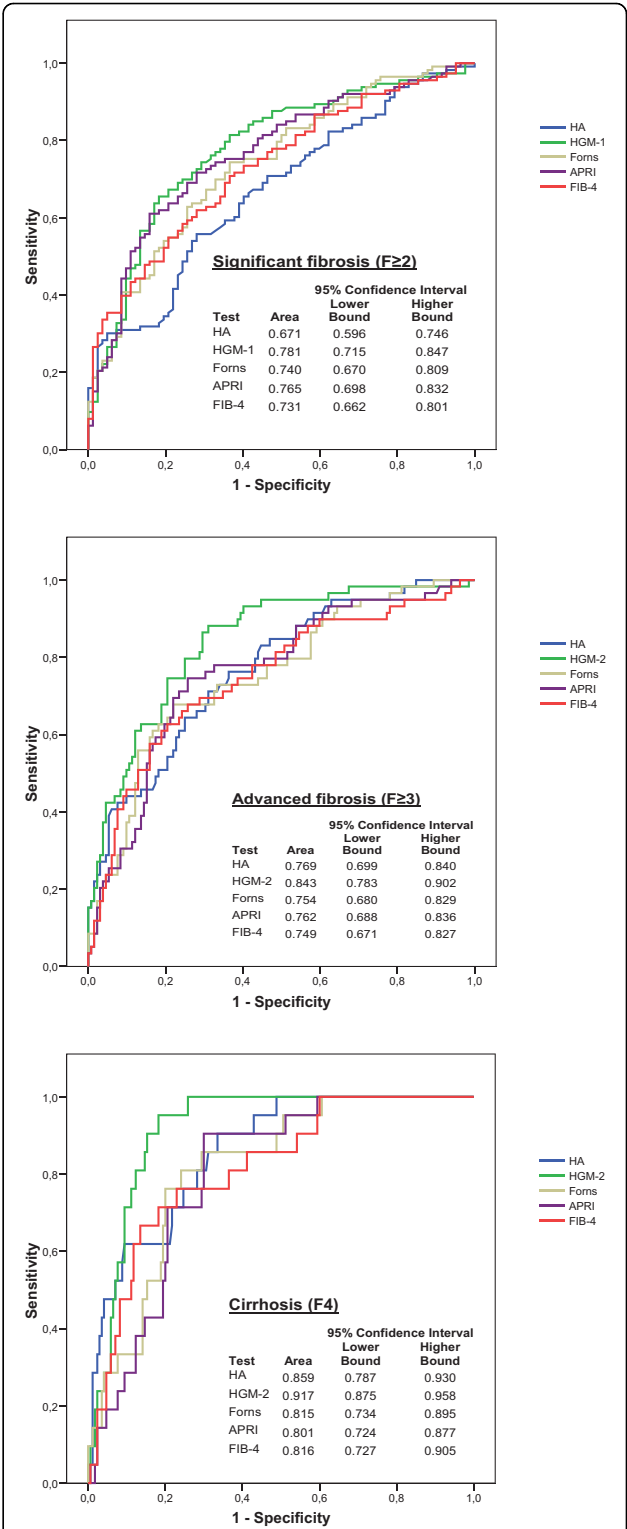


Figure 2 Area under the receiver operating characteristic (AUC-ROCs) curves of HA, HGM-1, HGM-2, FIB-4, APRI and Forns indexes for significant fibrosis ($F \geq 2$), advanced fibrosis ($F \geq 3$) and cirrhosis (F4).

Table 3 Diagnostic accuracy of hyaluronic acid (HA) measurement for significant fibrosis (F \geq 2), advanced fibrosis (F \geq 3) and cirrhosis (F4) in our cohort

Cut-off	TP	FP	TN	FN	(*) Se (95% CI)	(*) Sp (95% CI)	(*) PPV (95% CI)	(*) NPV (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)	DOR (95% CI)
Significant fibrosis (F\geq 2)											
430 (ng/mL)	111	71	13	6	94.9 (90.4 - 99.3)	15.5 (7.1 - 23.8)	61.0 (53.6 - 68.7)	68.4 (44.9 - 91.9)	1.12 (1.01 - 1.24)	0.33 (0.14 - 0.78)	3.39 (1.23 - 9.32)
1250 (ng/mL)	67	23	61	50	57.3 (47.9 - 66.7)	72.6 (62.5 - 82.7)	74.4 (64.9 - 84.0)	55.0 (45.2 - 64.7)	2.09 (1.43 - 3.06)	0.59 (0.46 - 0.75)	3.55 (1.9 - 6.5)
1800 (ng/mL)	36	4	80	81	30.8 (21.9 - 39.6)	95.2 (90.1 - 100)	90.0 (79.5 - 100)	49.7 (41.7 - 57.7)	6.46 (2.39 - 17.46)	0.73 (0.63 - 0.84)	8.89 (3.02 - 26.13)
Advanced fibrosis (F\geq 3)											
687 (ng/mL)	61	88	49	3	95.3 (89.3 - 100)	35.8 (27.4 - 44.2)	40.9 (32.7 - 49.2)	94.2 (86.9 - 100)	1.48 (1.29 - 1.70)	0.13 (0.04 - 0.40)	11.32 (3.37 - 37.99)
1250 (ng/mL)	47	43	94	17	73.4 (61.8 - 85.0)	68.6 (60.5 - 76.7)	52.2 (41.3 - 63.1)	84.7 (77.5 - 91.8)	2.34 (1.75 - 3.12)	0.39 (0.25 - 0.6)	6.04 (3.1 - 11.7)
2290 (ng/mL)	18	7	130	46	28.1 (16.3 - 39.9)	94.9 (90.8 - 98.9)	72.0 (52.4 - 91.6)	73.9 (67.1 - 80.6)	5.50 (2.42 - 12.51)	0.76 (0.63 - 0.91)	7.27 (2.85 - 18.52)
Cirrhosis (F4)											
1182 (ng/mL)	22	78	100	1	95.7 (85.1 - 100)	56.2 (48.6 - 63.7)	22.0 (13.4 - 30.6)	99.0 (96.6 - 100)	2.18 (1.81 - 2.63)	0.08 (0.01 - 0.53)	28.21 (3.72 - 213.86)
1320 (ng/mL)	21	63	115	2	91.3 (77.6 - 100)	64.6 (57.3 - 71.9)	25.0 (17.1 - 34.9)	98.3 (95.5 - 100)	2.58 (2.04 - 3.26)	0.13 (0.04 - 0.51)	19.17 (4.4 - 84.4)
2400 (ng/mL)	11	9	169	12	47.8 (25.2 - 70.4)	94.9 (91.4 - 98.4)	55.0 (30.7 - 79.3)	93.4 (89.5 - 97.3)	9.46 (4.40 - 20.36)	0.55 (0.36 - 0.82)	17.21 (5.98 - 49.57)

For each fibrosis stage, we chose a low cut-off at 95% sensitivity (Se) used to predict the absence of the disease and a high cut-off at 95% specificity (Sp) used to predict the presence of the disease.

Abbreviations: TP, true positive cases (correct diagnosis); FP, false positive cases (over-diagnosis); TN, true negative cases (correct diagnosis); FN, false negative cases (missed cases); Se, sensitivity; Sp, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR, likelihood ratio; DOR, diagnostic odds ratio; (*): values as percentage (%).

patients were misclassified (23 patients were false positive (FP) and 50 patients were false negatives (FN)) (Table 3). The diagnostic accuracy estimates, the PPV, NPV, LR-, LR+ and DOR, all of them were not good enough.

For advanced fibrosis (F \geq 3), using a low cut-off of 687 ng/mL, 49 of 137 (35.8%) patients with F \geq 3 were correctly identified, and only 3 of 64 (4.8%) patients with F \geq 3 were misclassified (40.9% PPV and 94.2% NPV). With a high cut-off of 2290 ng/mL, 18 of 64 (28.1%) patients with F \geq 3 were correctly identified and only 7 of 137 (5.1%) patients with F \geq 3 were misclassified (72% PPV and 73.9% NPV) (Table 3). Considering these low and high cut-off points, biopsies could have been avoided in 33.3% (67/201) of patients by using HA instead. When we applied an optimal cut-off of 1250 ng/mL, 141 patients were correctly identified (47 patients were TP and 94 patients were TN), and 60 patients were misclassified (43 patients were FP and 17 patients were FN) (Table 3). The NPV value almost reached 85% but the PPV, LR-, LR+ and DOR were not good enough.

For cirrhosis (F4), using a low cut-off of 1182 ng/mL, 100 of 178 (56.2%) patients with F \geq 4 were correctly identified, and only 1 of 23 (4.3%) patients with

F4 was misclassified (22.2% PPV and 99% NPV). With a high cut-off of 2400 ng/mL, 11 of 23 (47.8%) patients with F4 were correctly identified, and only 9 of 178 (5.1%) patients with F \geq 4 were misclassified (55% PPV and 93.4% NPV) (Table 3). Considering these low and high cut-off points, biopsies could have been avoided in 52.2% (111/201) of patients by using HA instead. When we applied an optimal cut-off of 1320 ng/mL, 136 patients were correctly identified (21 patients were TP and 115 patients were TN), and 65 patients were misclassified (63 patients were FP and 2 patients were FN) (Table 3). Using HA to predict cirrhosis, the NPV, LR-, and DOR value had good enough values.

Discussion

In this study, we found that serum HA levels were positively correlated with the stages of liver fibrosis. Moreover, the AUC-ROC increased with the stage of fibrosis with the highest value found for cirrhosis. HA was moderately accurate at the diagnosis of F \geq 2 (AUC-ROC of 0.676), while it seemed to be a very useful method for the detection of cirrhosis (AUC-ROC of 0.863). Many fibrosis experts would consider non-invasive tests for fibrosis with an AUC-ROC value of 0.85-0.90 to be as

good as liver biopsies for staging fibrosis [20]. Some authors have argued that some non-invasive markers of fibrosis might be even more accurate than biopsies and that most of the significantly discordant results between biopsies and non-invasive tests may be due to the method of obtaining biopsies that does not demonstrate the actual liver fibrosis state (sampling error when performing the biopsies) [21].

HA has been described as a component of several fibrosis indexes or as a single parameter for the non-invasive assessment of fibrosis/cirrhosis in HIV/HCV-coinfected patients [22-25]. In HIV/HCV-coinfected patients, there are few published studies with HA alone, and they are limited by their small sample sizes [25] or were designed to only evaluate significant fibrosis [23].

The diagnostic performance of HA was similar to the Forns, APRI, FIB-4, HGM-1 and HGM-2 indexes for our HIV/HCV-coinfected patients. We also found that the AUC-ROC of HA was similar to the AUC-ROC values of APRI, FIB-4, and Forns indexes obtained by other authors in HIV/HCV-coinfected patients [26-30] but lower than the AUC-ROC values of APRI, FIB-4, and Forns found in several studies carried out on HCV-monoinfected patients [11,12,31]. In summary, according to this study the performance of HA is not better than several biomarkers using parameters easily available in routine clinical practice in HIV/HCV-coinfected patients.

The clinical utility of HA in our study was low except for cirrhosis as the AUC-ROC for cirrhosis was the only one that was higher than 0.850. Also, the NPV was 99%, which could be acceptable for excluding cirrhosis. However, the PPV was only 55%, which is unacceptable for the diagnosis of cirrhosis; although this value can be explained due to the low number of cirrhotic patients in our cohort. Naturally, ruling out cirrhosis is of less importance in the management of patients than confirming such a diagnosis. According to all the available data, the practical interest of the isolated use of HA for assessing liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients in clinical practice seems to be rather low.

The advantage of HA over the other simple non-invasive indexes (APRI, FIB-4, HGM-1 and HGM-2) is that these indexes could be affected by some factors associated with HIV infection such as biochemical and haematological abnormalities and antiretroviral therapy [32-34], which can lead to an increase in transaminases or cholesterol in the blood [32-34]. HAART has increased the incidence of significant metabolic disturbances. These metabolic disturbances produce clinical manifestations which have an impact on the future health of the HIV-infected patient, including hyperlipidaemia, lipodystrophy, metabolic syndrome, cardiovascular disease and type 2 diabetes [35,36]. Moreover,

hepatotoxicity is a serious complication in patients taking HAART and coinfection with HCV increases the risk of liver toxicity while taking antiretroviral therapy [32]. HCV coinfection is associated with a 2 to 10-fold chance of developing elevated transaminase levels during HAART [33]. The evidence of severe hepatic dysfunction (coagulopathy or elevation of ammonia levels) is suggestive of severe toxicity and HAART should be discontinued. However, the simple indexes (APRI, FIB-4, HGM-1 and HGM-2) are calculated in a relatively easy way using parameters easily available in routine clinical practice. Even though HA is a single molecule, its quantification is not commonly measured in hospitals, it cannot be obtained from normal clinical data, and it is more expensive.

While HA has been shown to be accurate when used in combination with other parameters in HIV/HCV-coinfected patients (SHASTA index [24], HGM-3 [22]), its effectiveness at assessing liver fibrosis as an isolated marker is poorer. For instance, according to data published by our group very recently [22], the AUROC of HGM-3, a combination which includes HA, was 0.939 for $F \geq 3$, whereas the corresponding figure for HA alone reported here was 0.772. However, others authors have reported AUC-ROC values for Hepascore, Fibrometer and SHASTA (three indexes which include HA), and Fibrotest [30] similar to AUC-ROC values of HA in our patients.

Moreover, we used a commercial HA-ELISA test (Echelon Biosciences) different from the enzyme-linked protein binding assay (Hyaluronic Acid Test Kit, Corgenix, Westminster, CO, USA) or the sandwich enzyme binding assay kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) used by others authors [23,25,37-41]. To the best of our knowledge, this test has not previously been reported as a fibrosis test. So, this paper is a validation study of the HA-ELISA test (Echelon Biosciences) although the HA levels in this study are quite different (about 10 times larger) from those previously reported in HCV or HIV/HCV patients [23,25,38-41].

Aside from these laboratory biomarkers, liver fibrosis is evaluated using transient elastography (FibroScan) [42]. Our group reported an excellent diagnostic performance of liver stiffness for fibrosis and cirrhosis in HIV/HCV-coinfected patients [43], which was higher than the diagnostic performance of HA shown here.

The diagnostic performance analysis in our cohort had several limitations: a) the low number of patients; b) this study was made on patients with well preserved immune function and the extrapolation to individuals with more marked immune suppression would require further study; c) we did not directly compare HA with SHASTA, Fibrotest, Hepascore or Fibrometer because we did not have all the clinical routine variables needed

to calculate these indexes the day the liver biopsy was undertaken, and as a result of the use of the HA-ELISA test (Echelon Biosciences) the values of these combining scores would be quite different from those previously reported; d) we could not give exact information regarding biopsy length or portal tracts, but we found that only 1.68% of biopsies were defective for pathological diagnosis, and these cases were excluded from this study; e) only one pathologist read the biopsies and the biopsies were not validated by someone else; f) the uneven distribution of the stages of fibrosis in our cohort with a high proportion of absent to mild fibrosis and a low proportion of cirrhosis (11%). However, we carried out an analysis using the DANA method, which is used when the distribution of fibrosis stages are highly asymmetric [44], and we did not find a significant increase in AUC-ROC values (*data not shown*).

Conclusion

The diagnostic accuracy of serum HA levels increases gradually with the hepatic fibrosis stage. However, HA is better than other simple non-invasive indexes using parameters easily available in routine clinical practice only for the diagnosing of cirrhosis.

Abbreviations

AUC-ROCs: Area under these ROC curves; CHC: Chronic hepatitis C; $F \geq 2$: Significant fibrosis; $F \geq 3$: Advanced fibrosis; $F 4$: Cirrhosis; HA: Hyaluronic acid; HAART: Highly active antiretroviral therapy; HCV: Hepatitis C virus; HIV: Human immunodeficiency virus; NPV: Negative predictive value; PPV: Positive predictive value; SE: Sensitivity; SP: Specificity; LR: Likelihood ratio; DOR: Diagnostic odds ratio; TP: True positive cases (correct diagnosis); TN: True negative cases (correct diagnosis); FP: False positive cases (over-diagnosis); FN: False negative cases (missed cases).

Acknowledgements

The authors thank Nick Weber for writing assistance during the preparation of the manuscript

Sources of financial support: This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (Ref. PI052411; Ref. PI07/90201, Ref. UIPY 1467/07) and Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) (Ref. 36650/07) to SR. And from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (Ref. ISCIII-RETIC RD06/006; Ref. PI080928) and FIPSE (Ref. 36443/03; Ref. 36702/07) to JB. Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE 24534/05, 24632/07), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) of Ministerio de Ciencia e Innovación FIS (PI052476, PI061479); Red RIS RD06-0006-0035; Fundación Caja Navarra, Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006) and Task Force in Europe for Drug Development for the Young (TEDDY) to MAMF.

Meetings at which parts of the data were presented:

Resino S, Miralles P, Micheloud D, Bellón JM, Vargas A, Catalán P, Álvarez E, Cosín J, Lorente R, Sánchez-Conde M, Muñoz-Fernández MA, and Berenguer J. Diagnostic Accuracy of Serum Hyaluronic Acid for Advanced Fibrosis/ Cirrhosis in Patients Coinfected with HIV and HCV. 48th Annual International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)/Infectious Diseases Society of America (IDSA) 46th Annual Meeting. Washington, DC, USA. October 25-28, 2008.

Author details

¹Laboratory of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain. ²Biomedical Research Foundation, Hospital General Universitario

"Gregorio Marañón", Madrid, Spain. ³Agency for Health Technology Assessment, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁴Internal Medicine Department, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain. ⁵Infectious Diseases-HIV Unit, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain. ⁶Microbiology Department, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain. ⁷Pathology Department, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain. ⁸Molecular Immunobiology Laboratory, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain.

Authors' contributions

SR had primary responsibility for protocol development, participated in the design of the study performed the statistical analysis, and contributed to the writing of the manuscript. JMB, CA and AV participated in the design of the study, performed the statistical analysis, and contributed to the writing of the manuscript. RL carried out the immunoassays. EA had primary responsibility of fibrosis liver diagnosis. MMF, PM, PC, JCL, JC, and DM carried out patient screening, collecting and recording data, and contributed to the writing of the manuscript. JB conceived of the study, and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 March 2010 Accepted: 19 August 2010

Published: 19 August 2010

References

- Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Carnie J, Heeren T, Koziel MJ: **Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis.** *Clin Infect Dis* 2001, **33**(4):562-569.
- Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, del Olmo JA, Garcia-Bengoechea M, Hernandez-Quero J, Rey C, Abad MA, Rodriguez M, Sales Gilabert M, Gonzalez F, Miron P, Caruz A, Relimpio F, Torronteras R, Leal M, Lissen E: **Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis.** *J Hepatol* 1997, **26**(1):1-5.
- Bica I, McGovern B, Dhar R, Stone D, McGowan K, Scheib R, Snyderman DR: **Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection.** *Clin Infect Dis* 2001, **32**(3):492-497.
- Cacoub P, Geffray L, Rosenthal E, Perronne C, Veyssier P, Raguin G: **Mortality among human immunodeficiency virus-infected patients with cirrhosis or hepatocellular carcinoma due to hepatitis C virus in French Departments of Internal Medicine/Infectious Diseases, in 1995 and 1997.** *Clin Infect Dis* 2001, **32**(8):1207-1214.
- Dienstag JL: **The role of liver biopsy in chronic hepatitis C.** *Hepatology* 2002, **36**(5 Suppl 1):S152-160.
- Manning DS, Afdhal NH: **Diagnosis and quantitation of fibrosis.** *Gastroenterology* 2008, **134**(6):1670-1681.
- Guechot J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboudeau J, Poupon R: **Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy.** *J Hepatol* 1995, **22**(1):22-26.
- Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J: **Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis.** *Clin Chem* 1996, **42**(4):558-563.
- Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML: **Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection.** *Liver Int* 2006, **26**(9):1095-1099.
- Saitou Y, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Kawakita T, Yamamoto N, Sugimoto K, Murata K, Nakano T: **Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease.** *World J Gastroenterol* 2005, **11**(4):476-481.
- Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J: **Identification of chronic hepatitis**

- C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002, **36**(4 Pt 1):986-992.
12. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS: A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003, **38**(2):518-526.
 13. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, M SS, Torriani FJ, Dieterich DT, Thomas DL, Messinger D, Nelson M: Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006, **43**(6):1317-1325.
 14. Berenguer J, Bellon JM, Miralles P, Alvarez E, Sanchez-Conde M, Cosin J, Lopez JC, Alvarez F, Catalan P, Resino S: Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. *J Viral Hepat* 2007, **14**(12):859-869.
 15. Jacobs WH, Goldberg SB: Statement on outpatient percutaneous liver biopsy. *Dig Dis Sci* 1989, **34**(3):322-323.
 16. Bedossa P, Poynard T: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996, **24**(2):289-293.
 17. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL: Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988, **44**(3):837-845.
 18. Song HH: Analysis of correlated ROC areas in diagnostic testing. *Biometrics* 1997, **53**(1):370-382.
 19. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bonsel GJ, Bossuyt PM: The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003, **56**(11):1129-1135.
 20. Afdhal NH, Nunes D: Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004, **99**(6):1160-1174.
 21. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziv V: Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004, **50**(8):1344-1355.
 22. Resino S, Micheloud D, Miralles P, Bellon JM, Vargaa A, Catalan P, Alvarez E, Cosin J, Lorente R, Lopez JC, Munoz-Fernandez MA, Berenguer J: Diagnosis of advanced fibrosis in HIV and hepatitis C virus-coinfected patients via a new noninvasive index: the HGM-3 index. *HIV Med* 2010, **11**(1):64-73.
 23. Larrousse M, Laguno M, Segarra M, De Lazzari E, Martinez E, Blanco JL, Leon A, Deulofeu R, Miquel R, Milinkovic A, Lonca M, Miro JM, Biglia A, Murillas J, Gatell JM, Mallolas J: Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007, **46**(3):304-311.
 24. Kelleher TB, Mehta SH, Bhaskar R, Sulkowski M, Astemborski J, Thomas DL, Moore RE, Afdhal NH: Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *J Hepatol* 2005, **43**(1):78-84.
 25. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR: HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **40**(5):538-544.
 26. Trang T, Petersen JR, Snyder N: Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta* 2008, **397**(1-2):51-54.
 27. Macias J, Giron-Gonzalez JA, Gonzalez-Serrano M, Merino D, Cano P, Mira JA, Arizcorreta-Yarza A, Ruiz-Morales J, Lomas-Cabeza JM, Garcia-Garcia JA, Corzo JE, Pineda JA: Prediction of liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients by simple non-invasive indexes. *Gut* 2006, **55**(3):409-414.
 28. Loko MA, Castera L, Dabis F, Le Bail B, Winnock M, Coureau G, Bioulac-Sage P, de Ledinghen V, Neau D: Validation and comparison of simple noninvasive indexes for predicting liver fibrosis in HIV-HCV-coinfected patients: ANRS CO3 Aquitaine cohort. *Am J Gastroenterol* 2008, **103**(8):1973-1980.
 29. Tural C, Tor J, Sanvisens A, Perez-Alvarez N, Martinez E, Ojanguren I, Garcia-Samaniego JA, Rockstroh J, Barluenga E, Muga R, Planas R, Sirera G, Rey-Joly C, Clotet B: Accuracy of Simple Biochemical Tests in Identifying Liver Fibrosis in Patients Co-Infected With Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008, **7**(1):339-345.
 30. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, Pol S, Halfon P: Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovis study-ANRS HC02. *J Hepatol* 2008, **48**(5):765-773.
 31. Cales P, de Ledinghen V, Halfon P, Bacq Y, Leroy V, Boursier J, Foucher J, Bourliere M, de Muret A, Sturm N, Hunault G, Oberti F: Evaluating the accuracy and increasing the reliable diagnosis rate of blood tests for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2008, **28**(10):1352-1362.
 32. Kontorinis N, Dieterich D: Hepatotoxicity of antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 2003, **5**(1):36-43.
 33. Bonacini M: Liver injury during highly active antiretroviral therapy: the effect of hepatitis C coinfection. *Clin Infect Dis* 2004, **38**(Suppl 2):S104-108.
 34. Cole JL, Marzec UM, Gunthel CJ, Karpatsin S, Worford L, Sundell IB, Lennox JL, Nichol JL, Harker LA: Ineffective platelet production in thrombocytopenic human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood* 1998, **91**(9):3239-3246.
 35. Mallewa JE, Wilkins E, Vilar J, Mallewa M, Doran D, Back D, Pirmohamed M: HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 2008, **62**(4):648-660.
 36. Samaras K: Metabolic consequences and therapeutic options in highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(2):238-245.
 37. Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, Rawlins SR, Sanderson SO, Levine RA: Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, FIBROSpect II, and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2008, **103**(4):928-936.
 38. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziv V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F: Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002, **9**(2):128-133.
 39. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP: Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004, **99**(2):271-279.
 40. Sene D, Limal N, Messous D, Ghillani-Dalbin P, Charlotte F, Thiollere JM, Piette JC, Imbert-Bismut F, Halfon P, Poynard T, Cacoub P: Biological markers of liver fibrosis and activity as non-invasive alternatives to liver biopsy in patients with chronic hepatitis C and associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Clin Biochem* 2006, **39**(7):715-721.
 41. Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, Deydier R, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Allemand I, Rosenthal-Allier A, Ouzan D: Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol* 2005, **4**:6.
 42. Moreno S, Garcia-Samaniego J, Moreno A, Ortega E, Pineda JA, del Romero J, Tural C, von Wichmann MA, Berenguer J, Castro A, Espacio R: Noninvasive diagnosis of liver fibrosis in patients with HIV infection and HCV/HBV co-infection. *J Viral Hepat* 2009, **16**(4):249-258.
 43. Sanchez-Conde M, Montes-Ramirez ML, Miralles P, Castro Alvarez JM, Bellon JM, Ramirez M, Arribas JR, Gutierrez I, Lopez JC, Cosin J, Alvarez E, Gonzalez J, Berenguer J: Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers. *J Viral Hepat* 2010, **17**(4):280-6.
 44. Poynard T, Halfon P, Castera L, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Ratziv V, Benhamou Y, Bourliere M, de Ledinghen V: Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages. *Clin Chem* 2007, **53**(9):1615-1622.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/244/prepub

doi:10.1186/1471-2334-10-244

Cite this article as: Resino *et al.*: Can serum hyaluronic acid replace simple non-invasive indexes to predict liver fibrosis in HIV/Hepatitis C coinfecting patients?. *BMC Infectious Diseases* 2010 **10**:244.

6.2. Diagnosis of advanced fibrosis in HIV and hepatitis C virus-coinfected patients via a new noninvasive index: the HGM-3 index.

Resino S, Micheloud D, Miralles P, Bellón JM, **Vargas A**, Catalán P, Álvarez P, Cosín J, Lorente R, Carlos López J, Muñoz-Fernández M, and Berenguer J. *Diagnosis of advanced fibrosis in HIV and HCV co-infected patients via a new non-invasive index: The HGM-3 index*. HIV Med. 2010 Jan;11(1):64-73

Antecedentes: La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) modifica la historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) causando una rápida progresión a fibrosis, cirrosis, hepatocarcinoma y muerte. Determinar el estadio de fibrosis es esencial para evaluar a los pacientes con hepatitis crónica C. La biopsia hepática es la técnica de referencia para la evaluación de la fibrosis pero este procedimiento no está exento de inconvenientes y riesgos para el paciente.

Objetivo: Desarrollar un índice no invasivo a partir de marcadores plasmáticos para la identificación de fibrosis hepática en pacientes coinfectados por el VIH y VHC.

Diseño del estudio: Transversal.

Pacientes: Estudio realizado en 195 pacientes coinfectados con HIV/HCV sin tratamiento con interferón, con biopsia hepática realizada y con una muestra de suero.

Métodos: La población de estudio se dividió en dos grupos: a) grupo de estimación (70%), b) grupo de validación (30%). En el grupo de estimación se estudió las posibles asociaciones entre los diferentes biomarcadores de sangre periférica y la presencia de fibrosis avanzada (F3-F4) por medio de un análisis de regresión logística univariante. Después se seleccionaron las variables mas representativas y se hizo un índice predictivo de fibrosis avanzada (F3-F4) denominado HGM-3 que se evaluó en el grupo de validación.

Resultados El análisis estadístico mostró que el recuento de plaquetas, fosfatasa alcalina (ALP), Factor de crecimiento hepatocitario (HGF), Inhibidor de Metaloproteinasa tipo 1 (TIMP-1), y ácido hialurónico (HA) fueron asociados con fibrosis hepática avanzada y se utilizaron para construir el HGM-3; el cual tuvo valores más elevados en los pacientes con fibrosis avanzada y cirrosis, tanto en el grupo de estimación como de validación. Este índice predictivo de fibrosis fue evaluado mediante curvas ROC, tomando como "Gold Standard" el grado de fibrosis determinado por el patólogo en la biopsia hepática (escala METAVIR). El AUC fue superior a 0.90 en ambos grupos de estudio. El HGM-3 tuvo valores AUROC significativamente superiores a otros índices publicados previamente en la literatura (HGM-2, FIB-4, APRI, e índice de Forns). En el grupo de validación, el VPN del punto de corte bajo (<0.135) fue del 97% y el VPP del punto de corte alto (>0.570) fue del 76.9%

Conclusiones: HGM-3 puede ser un método no invasivo muy útil en clínica para diagnosticar fibrosis avanzada en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

Diagnosis of advanced fibrosis in HIV and hepatitis C virus-coinfected patients via a new noninvasive index: the HGM-3 index

S Resino,¹ D Micheloud,¹ P Miralles,² JM Bellón,³ A Vargas,¹ P Catalán,⁴ E Álvarez,⁵ J Cosin,² R Lorente,⁶ JC López,² MA Muñoz-Fernández⁶ and J Berenguer²

¹Laboratory of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, ²Infectious Diseases-HIV Unit, ³Biomedical Research Foundation, ⁴Microbiology Department, ⁵Pathology Department and ⁶Molecular Immunobiology Laboratory, Hospital General Universitario 'Gregorio Marañón', Madrid, Spain

Background

Noninvasive tests are increasingly being used for the assessment of liver fibrosis. We aimed to develop a serum index for the identification of advanced fibrosis ($F \geq 3$) in HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients.

Methods

We carried out a cross-sectional study on a group of 195 patients comprised of an estimation group (EG; $n = 127$) and a validation group (VG; $n = 68$) who all underwent liver biopsy and had not received previous interferon therapy. Liver fibrosis was estimated using the METAVIR score. We developed a new serum index (HGM-3) dependent on levels of platelets, alkaline phosphatase, hepatic growth factor, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and hyaluronic acid.

Results

In the EG, the area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC) of HGM-3 for identification of $F \geq 3$ was 0.939 [95% confidence interval (CI) 0.899, 0.979] which was significantly higher than the AUC-ROC of the HGM-2, FIB-4, aspartate aminotransferase to platelet ratio (APRI) and Forns' indexes. With HGM-3 < 0.135 for $F < 3$, 57 patients were correctly identified and two patients were misclassified. We found the presence of $F < 3$ with 96.6% certainty. The negative likelihood ratio (LR) was < 0.1 and the diagnostic odds ratio (DOR) was > 40 . With HGM-3 > 0.570 in the EG for $F \geq 3$, 31 patients were correctly identified, and five patients were misclassified. We found the presence of $F \geq 3$ with 86.1% certainty. The positive LR was > 12 and the DOR was > 40 . For the VG, the diagnostic accuracy values were similar to the values for the EG.

Conclusions

HGM-3 appears to be an accurate noninvasive method for the diagnosis of bridging fibrosis and cirrhosis in HIV/HCV-coinfected patients.

Keywords: liver cirrhosis, serum predictive markers, liver fibrosis, diagnostic accuracy, chronic hepatitis C

Accepted 14 May 2009

Introduction

HIV infection adversely impacts the natural pathology of hepatitis C virus (HCV) infection, causing a more rapid progression to fibrosis and the development of cirrhosis, hepatic decompensation, hepatocellular carcinoma and death [1–5]. For this reason, all HIV-infected individuals should be screened for HCV infection, and all individuals

Correspondence: Dr Salvador Resino, Laboratorio de Epidemiología Molecular de enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III), Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km 2.2, 28220 Majadahonda (Madrid), Spain. Tel: + 34 918 223 266; fax: + 34 915 097 946; e-mail: sresino@isci.es

with positive results for HCV RNA should be candidates for anti-HCV treatment, provided that HIV infection is well controlled and there are no contraindications to therapy with interferon or ribavirin.

Grading and staging of liver inflammation and fibrosis are considered essential components of the management of patients with chronic hepatitis C. Patients with bridging fibrosis are at a high risk of developing cirrhosis in the ensuing decade [6], so there is little doubt that these patients as well as patients with established liver cirrhosis have a real need to initiate HCV antiviral therapy. The latter group of patients also need more careful monitoring and additional diagnostic tests including periodic oesophago-gastroduodenoscopy to detect oesophageal varices as well as imaging and other techniques to screen for hepatocellular carcinoma. The survival rate of HIV/HCV-coinfected patients with cirrhosis after the first episode of hepatic decompensation is extremely poor [7,8].

Liver biopsy is still considered the 'reference standard' for the assessment of liver fibrosis [9]. However, this procedure has several limitations, including its invasive nature, which can lead to complications, inadequate biopsy size, intra- and inter-observer variability, tissue fragmentation, cost, and low acceptance by most patients [10–12]. In recent years, these limitations have led to the development of alternative noninvasive procedures to measure the degree of liver fibrosis. These methods are currently divided into two main categories: imaging methods, such as transient elastography [13], and assays based on serum biomarkers [14]. The potential advantages of these methods are that they are noninvasive, are easier to perform for patients and clinicians, and can be repeated periodically. Indirect markers associated with fibrosis such as routine biochemistry and platelet analyses have been incorporated into several fibrosis indexes such as the aspartate aminotransferase to platelet ratio (APRI), FIB-4, and Forns' indexes [15–17].

In this study, we aimed to develop a noninvasive index with markers derived from peripheral blood to estimate the diagnostic accuracy of advanced stages of fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients.

Patients and methods

Patients

The patients for this cross-sectional study came from the HIV out-patient clinic of the Hospital Gregorio Marañón in Madrid, Spain. Patients with documented HIV/HCV coinfection who underwent liver biopsies between May 2000 and May 2007 were included in the study. Liver biopsies were performed on patients who were potential candidates

for HCV therapy and had not received previous interferon therapy. The inclusion criteria were: availability of a frozen serum sample collected on the day of liver biopsy, no clinical evidence of hepatic decompensation, detectable HCV RNA by polymerase chain reaction (PCR), negative hepatitis B surface antigen, CD4 lymphocyte count higher than 200 cells/ μ L, stable antiretroviral therapy or no need for antiretroviral therapy, and the absence of diabetes, active opportunistic infections, and active drug or alcohol addiction. In our cohort of patients, 297 HIV/HCV-coinfected patients had liver biopsy data by May 2007, but only 195 of these 297 patients could be included because they also had had a serum sample collected and frozen. All work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave their written consent for the liver biopsy and the Institutional Ethics Committee approved the study.

Clinical and laboratory data

On the day of the biopsy, the following information was obtained from the medical records: age, gender, risk category, weight, height, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) clinical category, nadir CD4 T-cell count, prior antiretroviral therapy, antiretroviral treatment at the time of liver biopsy and total time on highly active antiretroviral therapy (HAART). The duration of HCV infection for patients with a history of injecting drug use was estimated to begin in the first year needles were shared. Patients were questioned in relation to alcohol consumption. We considered the consumption of >50 g of alcohol per day for ≥ 12 months as a high intake. After an overnight fast and immediately before the liver biopsy was performed, a blood sample was taken from the patient for analysis of complete blood counts, liver panel, basic metabolic panel, coagulation tests, plasma HIV RNA levels and CD4 T-cell counts. Also, a fasting serum sample was immediately stored and frozen (-70°C) for further assays. All patients gave written consent for the samples to be collected.

HIV and HCV infections were documented in all patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and PCR. The HCV viral load was measured by PCR (Cobas Amplicor HCV Monitor Test; Branchburg, NJ, USA) and the results are reported in IU/mL. HCV genotype was determined by hybridization of biotin-labelled PCR products to oligonucleotide probes bound to nitrocellulose membrane strips (INNO-LiPA HCV II; Innogenetics, Ghent, Belgium).

Serum markers analysed

In our study, serum markers were measured from a blood sample taken before liver biopsy. A multiplex suspension

bead array immunoassay was performed using the Luminex 100™ analyser (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) to identify protein expression in frozen serum samples according to the manufacturers' specifications. A multiplex kit (LINCOplex™; LINCO Research, St Charles, MO, USA) was used to specifically evaluate the following markers: insulin, leptin, hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF), soluble Fas-associated death domain protein ligand (sFasL), soluble Fas-associated death domain protein (sFas), macrophage migration inhibitory factor (MIF), soluble intercellular adhesion molecule (sICAM), and soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM). A minimum of 100 events (beads) were collected for each protein sample, and median fluorescence intensities (MFIs) were obtained. Analyte protein concentrations were automatically calculated based on standard curve data using MasterPlex™ QT Analysis version 2 (MiraiBio Inc., Alameda, CA, USA). A five-parameter regression formula was used to calculate the sample concentrations from the standard curves.

Using commercially available reagents, we also tested via ELISA: hyaluronic acid (HA; HA-ELISA; Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA), angiopoietin-II (Ang-2; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), and YKL-40 (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA).

In each patient, the degree of insulin resistance (IR) was estimated by the homeostatic model assessment method (HOMA) described by Matthews *et al.* [18]. In particular, an IR score (HOMA-IR) was obtained from samples acquired from fasting patients using the formula: $[\text{plasma glucose (mmol/L)} \times \text{serum insulin (mU/L)}] / 22.5$.

Liver biopsy and histology

Liver biopsies were performed on an outpatient basis following the recommendations of the Patient Care Committee of the American Gastroenterological Association [19]. All liver biopsies were performed by the same physicians (J.B. and P.M.) with a suction needle (HISTOCUT 16G; Sterylab Srl., Milan, Italy). Ultrasound was routinely used to determine the percutaneous biopsy site. We did not record systematically the size of liver biopsy specimens; however, during the study period, five out of 297 biopsies yielded insufficient liver tissue for pathological diagnosis.

The liver tissue sections were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with haematoxylin-eosin, Mason's trichrome, and Perls' iron. The samples were evaluated by a pathologist (E.A.) who was unaware of the

patients' clinical or laboratory data. Liver fibrosis was estimated following the criteria established by the META-VIR Cooperative Study Group [20]. Fibrosis was scored as follows: F0, no fibrosis; F1, portal fibrosis; F2, periportal fibrosis or rare portal-portal septa; F3, fibrous septa with architectural distortion but with no obvious cirrhosis (bridging fibrosis); and F4, definite cirrhosis. The researchers in charge of evaluating the biopsies, interpreting the clinical data, or calculating and analysing the reference standard all performed each function without knowledge of the results of the other evaluations.

Statistics

Overall, results are presented as medians (percentile 25, percentile 75) for continuous variables and as frequencies and percentages for categorical data. Analysis of normality was performed with the Kolmogorov-Smirnov test. Categorical data and proportions were analysed using the χ^2 test or Fisher's exact test as required. The Student *t*-test was used to compare the means of the two groups with normal distributions and the Mann-Whitney test to compare variables with nonnormal distributions. An analysis of variance (ANOVA) adjusted with the Bonferroni test was used to compare the means of three or more groups with normal distributions. Multiple association tests were performed using univariate logistic regression and forward stepwise logistic regression analyses to identify the independent variables associated with the primary endpoint (advanced fibrosis; $F \geq 3$). In the last analysis we included all variables that were statistically significant ($P < 0.05$) in the univariate analysis. A forward stepwise logistic regression analysis was conducted with *P*-values for entry and exit of 0.05 and 0.10, respectively. We developed a new index for advanced fibrosis ($F \geq 3$) diagnosis using a logistic probability function that we have called HGM-3.

We evaluated the diagnostic values of HGM-3 by calculating the areas under the receiver operating characteristic curves (AUC-ROCs) for the estimation and validation groups. For purposes of comparison, we also evaluated four simple reported models consisting of routine parameters to predict liver fibrosis: (a) HGM-1 and HGM-2 [21], (b) FIB-4 [17], (c) APRI [16] and (d) Forns' indexes [15]. We evaluated the diagnostic value of these indexes by comparing the calculated AUC-ROCs [22,23] for all patients included in this study.

Moreover, we evaluated new cut-offs for the HGM-3 index according to a sensitivity (Se) of 95% for the low cut-off used to predict liver biopsies without advanced fibrosis ($F < 3$); and a specificity (Sp) of 95% for the high cut-off used to predict liver biopsies with advanced fibrosis ($F \geq 3$). We calculated the Se, Sp, positive predictive value and

negative predictive value for each cut-off point to evaluate the diagnostic accuracy. We also calculated the diagnostic odds ratio (DOR) which expresses the strength of the association between the test result and disease: it is the ratio of the odds of a positive result in a person with the target condition compared to a person without the condition [24]. A DOR of 1 suggests the test provides no diagnostic evidence. Moreover, we also calculated the likelihood ratios (LRs), which describe how many times a person with the target condition is more likely to have a particular test result than a person without that condition. LRs affect the probability that a target condition is present after the test has been performed. Binary tests have two LRs, positive and negative (LR+ and LR-). An LR of 1 indicates no diagnostic value.

All tests were two-tailed, with P -values <0.05 considered to be significant. Statistical analysis was performed using SPSS 14.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and STATA 9.1 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Results

Patients

We randomly divided the 195 patients who underwent liver biopsy into two groups: an estimation group ($n = 127$; 65%) and a validation group ($n = 68$; 35%). The two groups had similar baseline characteristics except for a lower frequency of high alcohol intake and a higher serum concentration of YKL-40 in the estimation group compared with the validation group (Table 1).

Predictive markers of advanced fibrosis ($F \geq 3$)

In the estimation group, we identified clinical and laboratory variables associated with advanced fibrosis by univariate logistic regression analysis (Table 2). Univariate analysis revealed that a high number of variables were associated with advanced fibrosis ($F \geq 3$). Eventually, six variables [platelet count, alkaline phosphatase (ALP), HGF, TIMP-1, HA and time on HAART (months)] were identified as independent predictors of advanced fibrosis by forward stepwise logistic regression analysis (Table 3). However, we only included the markers obtained from peripheral blood (platelet count, ALP, HGF, TIMP-1 and HA) to develop a new index for advanced fibrosis ($F \geq 3$) which we have called HGM-3:

$$\Pr(F \geq 3) = \frac{1}{1 + e^{-x}}$$

$$\begin{aligned} x = & -5.0596 - (1.210 \times 10^{-2} \times \text{Platelet}) \\ & + (1.203 \times 10^{-2} \times \text{ALP}) \\ & + (1.220 \times 10^{-3} \times \text{HA}) + (4.526 \times 10^{-4} \times \text{HGF}) \\ & + (6.312 \times 10^{-3} \times \text{TIMP} - 1) \end{aligned}$$

Performance of HGM-3

Figure 1(a) and (b) show that the HGM-3 index increased significantly with stage of hepatic fibrosis in both the estimation and validation groups. We found statistical differences when comparing F3–F4 with F0–F1 and F2; and when comparing F4 with F0–F1, F2 and F3 ($P < 0.05$). We found similar values of AUC-ROCs for the validation and estimation groups (Fig. 1C). Moreover, the AUC-ROC values for significant fibrosis ($F \geq 2$) of the HGM-3 were similar to those of the HGM-1, FIB-4, APRI and Forns' indexes ($P < 0.05$) (Table 4). However, the AUC-ROC values for advanced fibrosis ($F \geq 3$) of the HGM-3 were significantly higher than those of the HGM-2, FIB-4, APRI and Forns' indexes ($P < 0.05$) (Table 4). Moreover, the AUC value of HGM-3 for the diagnosis of cirrhosis (F4) was also higher than those for the FIB-4, APRI and Forns' indexes (Table 4) but we did not find statistically significant differences between HGM-3 and HGM-2.

Diagnosis of advanced fibrosis ($F \geq 3$)

With the low HGM-3 cut-off point (<0.135) in the estimation group, 57 patients were correctly identified (true negatives without advanced fibrosis), and only two patients were misclassified (false negatives with advanced fibrosis) (Table 5). We found the presence of $F < 3$ with 96.6% certainty. The LR- was very low and the DOR was >40 . The percentage of patients correctly identified was $<80\%$. For the validation group, the diagnostic accuracy values were similar to the values for the estimation group (Table 5).

When we applied the high HGM-3 cut-off (>0.570) to the estimation group, 31 patients were correctly identified (true positive with advanced fibrosis), and only five patients were misclassified (false positive without advanced fibrosis) (Table 5). We found the presence of $F \geq 3$ with 86.1% certainty. The LR+ was very high and the DOR was >40 . The percentage of patients correctly identified was $>80\%$. However, the diagnostic accuracy values for the validation group were slightly worse than those for the estimation group, but the difference was not statistically significant (Table 5). We found the presence of $F \geq 3$ with 76.9% certainty. The sensitivity value was lower, and the LR+ and DOR were also lower than for the estimation group.

Table 1 Characteristics of the 195 HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients who underwent a liver biopsy

	Estimation group	Validation group	All patients
No. HIV-1-infected patients*	127	68	195
Male*	96 (75.6)	51 (75)	147 (75.4)
Age (years) [†]	39.5 (36.8, 43)	38.7 (36.8, 43.6)	39.5 (36.8, 43.3)
HIV acquired by IDU*	111 (87.4)	63 (92.6)	174 (89.2)
Prior AIDS diagnosis*	38 (29.9)	22 (32.4)	60 (30.8)
Years since HCV infection [†]	21.6 (18.1, 24.7)	20.7 (17.4, 23.6)	21.3 (17.7, 24.5)
High alcohol intake*	13 (10.3)	14 (20.6)*	27 (13.9)
Antiretroviral therapy			
No treatment*	7 (5.5)	3 (4.4)	10 (5.1)
PI-based*	27 (21.3)	20 (29.4)	47 (24.1)
NNRTI-based*	66 (52)	35 (51.5)	101 (51.8)
Triple NRTI-based*	18 (14.2)	6 (8.8)	24 (12.3)
Other*	9 (7.1)	4 (5.9)	13 (6.7)
Months on HAART (<i>n</i> = 178) [†]	50.7 (33.4, 63.5)	52.2 (34.9, 87.2)	51 (34.3, 65.8)
Stage of liver fibrosis*			
F0	7 (5.5)	8 (11.8)	15 (7.7)
F1	38 (29.9)	29 (42.6)	67 (34.4)
F2	39 (30.7)	13 (19.1)	52 (26.7)
F3	28 (22)	10 (14.7)	38 (19.5)
F4	15 (11.8)	8 (11.8)	23 (11.8)
HIV markers			
Nadir CD4 count (cells/ μ L) [†]	210 (100, 331)	215 (115, 325)	210 (103, 325)
Baseline CD4 count (cells/ μ L) [†]	490 (360, 660)	527 (397, 744)	493 (373, 667)
HIV RNA < 50 copies/mL*	99 (78)	51 (75)	150 (76.9)
Log ₁₀ VL (copies/mL) (<i>n</i> = 45) [†]	2.99 (2.69, 3.8)	3.66 (2.91, 4.09)	3.23 (2.71, 3.98)
HCV markers*			
HCV genotype			
1-4	102 (81.6)	48 (71.6)	150 (78.1)
3	23 (18.4)	19 (28.4)	42 (21.9)
HCV RNA > 850 000 copies/mL	77 (75.5)	43 (74.1)	120 (75)
Haematological parameters [†]			
Platelet count ($\times 10^9$ cells/L)	177 (142, 221)	189 (139, 231)	178 (141, 223)
Fibrinogen (mg/dL)	260 (228, 310)	256 (229, 286)	259 (228, 305)
INR	1 (1, 1.05)	1 (0.97, 1)	1 (1, 1.02)
Biochemical parameters [†]			
Glucose (mg/dL)	88 (79, 97)	85.5 (77, 93)	87 (78, 96)
ALP (IU/dL)	124 (85, 196)	123 (76, 194)	124 (81, 196)
AST (IU/dL)	61 (39, 92)	52 (37.5, 75.5)	57 (38, 85)
GGT (IU/dL)	107 (59, 244)	122 (53, 196)	113 (59, 211)
ALT (IU/dL)	87 (49, 137)	65.5 (49, 94.5)	77 (49, 118)
AST/ALT	0.74 (0.59, 0.96)	0.77 (0.62, 1.03)	0.76 (0.62, 0.97)
Cholesterol (mg/dL)	170 (148, 192)	173 (144, 208)	170 (148, 196)
Fibrosis markers [†]			
Insulin (pg/mL)	480 (336, 748)	481 (405, 780)	481 (360, 768)
HOMA	3 (2, 4)	2 (2, 5)	2 (2, 4)
Leptin (pg/mL)	3836 (1706, 9636)	3779 (1850, 9064)	3836 (1778, 9387)
HGF (pg/mL)	1535 (917, 2759)	1790 (1134, 3150)	1636 (987, 2927)
NGF (pg/mL)	9 (4, 15)	10 (6, 16)	9 (5, 15)
sFasL (pg/mL)	103 (67, 155)	89 (50, 139)	99 (55, 155)
sFas (pg/mL)	11419 (6381, 18865)	9482 (4261, 17763)	10887 (5523, 18789)
MIF (pg/mL)	1796 (895, 3167)	1516 (1137, 2812)	1653 (961, 2904)
sICAM (pg/mL)	519166 (397948, 954064)	512922 (427156, 865666)	518318 (404938, 954064)
sVCAM (pg/mL)	894728 (501227, 1720604)	925408 (392543, 1590870)	912158 (470112, 1661370)
HA (pg/mL)	1203 (624, 1742)	1125 (713, 1620)	1185 (656, 1654)
Ang-II (pg/mL)	4420 (2973, 7686)	5003 (2651, 8392)	4758 (2711, 7745)
TIMP-1 (ng/mL)	277 (177, 401)	240 (89, 351)	265 (156, 394)
YKL-40 (ng/mL)	2170 (945, 5771)	1583 (735, 3390)*	1954 (845, 4624)
MMP-1 (ng/mL)	163 (140, 280)	184 (148, 320)	165 (142, 292)
MMP-2 (ng/mL)	116 (83, 500)	105 (80, 473)	111 (82, 493)

*Absolute number (percentage).

[†]Median (percentile 25, percentile 75).

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; Ang-II, angiotensin II; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; HAART, highly active antiretroviral therapy; HCV, hepatitis C virus; HGF, hepatocyte growth factor; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HOMA, insulin resistance score; IDU, injecting drug use; INR, international normalized ratio; MIF, macrophage migration inhibitory factor; MMP-1, matrix metalloproteinase-1; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; NGF, nerve growth factor; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; HIV RNA, HIV plasma viral load; HCV RNA, HCV plasma viral load; sFasL, serum-soluble Fas-associated death domain protein ligand; sFas, serum-soluble Fas-associated death domain protein; sICAM, soluble intercellular adhesion molecule; sVCAM, soluble vascular cell adhesion molecule; HA, hyaluronic acid; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1; YKL-40, also known as human cartilage 39 (HC gp-39).

Table 2 Variables assessed for association with advanced fibrosis ($F \geq 3$) in all HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients

Clinical	Sex, age at biopsy, HIV transmission category, CDC clinical category, duration of HCV infection, and antiretroviral therapy (use of HAART, type of HAART, and years on HAART*)
Routine laboratory tests	Platelets*, INR*, ALP*, AST*, ALT*, GGT, cholesterol, CD4 cell count (nadir and at the time of biopsy), HIV RNA viral load, HCV-1 or HCV-4 genotype, and HCV RNA viral load*
Nonroutine laboratory tests	Insulin, HOMA-IR (≥ 3.8)*, leptin, HGF*, NGF, sFasL, sFas*, MIF, sICAM*, sVCAM*, HA*, Ang-2*, TIMP-1*, YKL-40*, MMP-1 and MMP-2
Pathology	Distribution of liver fibrosis: stage 0 (no fibrosis), stage 1 (portal fibrosis), stage 2 (periportal fibrosis), stage 3 (bridging fibrosis) and stage 4 (cirrhosis)

*Univariate analysis revealed that years on HAART, platelet count, INR, ALP, AST, ALT, HCV RNA viral load, HOMA-IR (≥ 3.8), HGF, sFas, sICAM, sVCAM, HA, Ang-2, TIMP-1 and YKL-40 were all associated with advanced fibrosis ($F \geq 3$).

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; Ang-2, angio-poitin-II; AST, aspartate aminotransferase; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; GGT, gamma glutamyl transpeptidase, HA, hyaluronic acid; HAART, highly active antiretroviral therapy; HGF, hepatocyte growth factor; HOMA-IR, insulin resistance score; INR, international normalized ratio; NGF, nerve growth factor; sFasL, soluble Fas-associated death domain protein ligand; sFas, soluble Fas-associated death domain protein; MIF, macrophage migration inhibitory factor; MMP-1, matrix metalloproteinase-1; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; sICAM, soluble intercellular adhesion molecule; sVCAM, soluble vascular cell adhesion molecule; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1; YKL-40, also known as human cartilage 39 (HC gp-39).

Table 3 Summary of results for forward stepwise multivariate logistic regression analysis for the estimation group

Advanced fibrosis ($F \geq 3$)	OR	95% CI	P-value
Time on HAART (months)	0.957	0.927 0.988	0.007
Platelet count ($\times 10^9$ cells/L)	0.982	0.967 0.997	0.022
ALP (IU/dL)	1.012	1.003 1.020	0.007
HGF (pg/mL)	1.001	1.000 1.002	0.001
HA (pg/mL)	1.002	1.001 1.003	0.003
TIMP-1 (ng/mL)	1.009	1.004 1.014	0.001

ALP, alkaline phosphatase; CI, confidence interval; HA, hyaluronic acid; HGF, hepatocyte growth factor; OR, odds ratio; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

Discussion

In this study, we aimed to develop a noninvasive index in order to identify advanced liver fibrosis in a series of 195 HIV/HCV-coinfected patients naïve to anti-HCV treatment. Patients were randomly divided into an estimation group and a validation group. We assessed routine laboratory data as well as markers of extracellular matrix (ECM) metabolism, inflammation, growth factors and IR. In the estimation group, univariate analyses revealed that platelet count, ALP, HGF, TIMP-1 and HA were all associated with advanced liver fibrosis. With these markers, we developed a new index using a logistic probability function which we

have designated HGM-3. We did not include 'time on HAART' in the final model because the models with and without 'time on HAART' were not significantly different. Moreover, it is often difficult to calculate the time on HAART for patients who change their centre of reference several times or for whom the clinical history is incomplete. HGM-3 had an AUC-ROC for the identification of advanced liver fibrosis higher than 0.90, which was significantly higher than the AUC-ROC obtained with the HGM-2, FIB-4, APRI or Forns' index. These results confirm that HGM-3 is an accurate noninvasive method for the detection of bridging fibrosis and cirrhosis in HIV/HCV-coinfected patients.

Liver fibrosis is considered a dynamic process characterized by matrix remodelling and excessive deposition of ECM proteins including collagen [25,26]. Currently, two types of serum markers of liver fibrosis have been used: indirect markers that reflect alterations in hepatic function but do not directly reflect ECM metabolism (i.e. platelet count, coagulation studies, etc.), and direct markers that reflect qualitative and quantitative changes in ECM macromolecules [9].

We evaluated a variety of standard indirect markers of liver fibrosis. By multivariate analysis, we found platelet count and ALP to be independent predictive markers of advanced fibrosis. Our findings echo the results of many previous studies which showed that platelet count and ALP levels were important predictors of either significant fibrosis or cirrhosis [27]. Among the direct markers of liver fibrosis we found a good correlation between TIMP-1 and HA serum levels and the stage of fibrosis. Both markers showed an excellent predictive value for advanced fibrosis, confirming the results of other studies [28–30]. In our study, several other markers failed to show any predictive value for advanced fibrosis. These markers consisted of matrix remodelling indicators such as MMP-1, MMP-2 and YKL-40, as well as several molecules related to regulation of metabolism (leptin, insulin, and NGF) and inflammation (sICAM, sVCAM, sFas, sFasL and MIF).

Notably, we found that HGF is a good predictive marker of advanced liver fibrosis. To the best of our knowledge, this is the first study that shows that serum HGF is a good predictive marker of advanced liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. HGF is a factor for paracrine cellular growth, motility and morphogenesis. It is secreted by mesenchymal cells and targets and acts primarily upon epithelial and endothelial cells, but also acts on haemopoietic progenitor cells. It has been shown to have a major role in embryonic organ development, in adult organ regeneration and in wound healing. Serum HGF levels are strongly associated with liver diseases, obesity, IR, and metabolic syndrome [31]. It is possible that elevated HGF

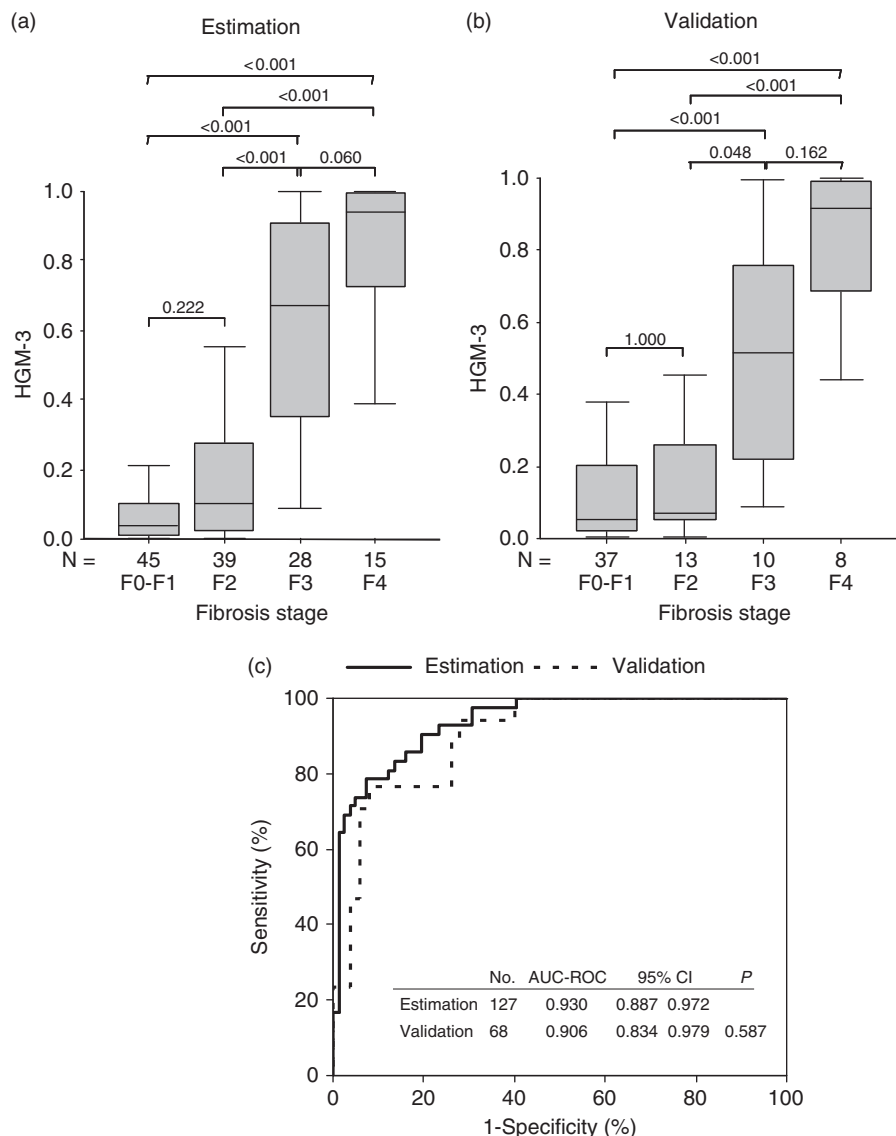


Fig. 1 Box plots illustrating the distribution of HGM-3 values against fibrosis score for the estimation (a) and validation (b) groups. Horizontal lines inside each box represent the median, and the lower and upper borders of the box encompass the interquartile range. The vertical lines from the ends of each box encompass the extreme data points. (c) Diagnostic values of the new index (HGM-3) for prediction of advanced fibrosis (F3, F4) in the estimation and validation groups. CI, confidence interval; AUC-ROC, area under the receiver operating characteristic curve.

levels reflect significant liver damage or, alternatively, an imbalance between HGF clearance and production which could be an indicator of liver dysfunction because the liver is the major organ through which HGF is eliminated from systemic circulation.

Many experts believe that current noninvasive tests of hepatic fibrosis cannot yet replace liver biopsies [27,32–34]. However, in one prospective study, comparing liver biopsies with a noninvasive index, it was found that the size of the liver biopsy was inadequate in a significant

proportion of patients with chronic hepatitis C. Moreover, when biopsy and marker results were discordant, an explanation could be identified in more than two-thirds of the cases and, in those cases, biopsy failure was more than seven times more common than diagnostic failure of serum markers [35]. Some experts would consider non-invasive serum tests of fibrosis with AUC-ROC areas of 0.85–0.90 to be as good as a liver biopsy for staging fibrosis [36]. The AUC-ROC of HGM-3 for the detection of advanced fibrosis was higher than 90%; a value of

accuracy that has not been previously achieved with other markers for HIV/HCV-coinfected patients [30,37,38]. Furthermore, we found that HGM-3 had higher diagnostic accuracy than the HGM-2, APRI, FIB-4 or Forns' index [15–17,21]. It is important to note that this sample cohort is a subgroup of patients included in a previous report in which we estimated the HGM-2 index [21], and we found that the HGM-3 was more accurate than the HGM-2 index. Noninvasive serum panels such as APRI, FIB-4 and Forns' indexes are very cheap and widely available but are relatively inaccurate at diagnosing HIV/HCV coinfection [39–41]. The HGM-3 model contains some nonroutine tests that are not widely available and may be expensive if they

were to perform the ELISA classic, which makes the model less attractive as it may not be possible for most clinicians to use it. However, at present, these molecules can be measured using a new Luminex-based assay in a quick and inexpensive way.

HGM-3 also gave good results for cirrhosis diagnosis, but we found similar AUC-ROC values for HGM-3 and HGM-2. In our opinion, HGM-3 is less useful for diagnosis of cirrhosis or advanced fibrosis because HGM-2 is calculated from indirect markers associated with fibrosis such as routine biochemistry and platelet data which are widely available and very inexpensive [21]. Moreover, we were unable to assess the diagnostic accuracy in the estimation and validation groups because of the low number of patients with cirrhosis included in this study.

The identification of this index in HIV-positive individuals is also of importance as HIV infection may alter the expression of many of the immune, apoptotic and ECM markers. However, this study had several limitations. (1) The low number of patients. (2) The study was limited to patients with well-preserved immune function and extrapolation to individuals with more marked immune suppression will require further study. (3) We did not compare HGM-3 with SHASTA, Fibrotest, Hepascore and Fibrometer because we did not have all the variables needed to calculate these indexes. (4) HGM-3 was derived from the majority of this combined cohort and so would be expected to perform optimally in this cohort; whereas the other indexes tested (APRI, FIB-4 and Forns' indexes) were not optimized in this cohort and would be expected to perform less well. (5) We cannot give exact information regarding biopsy length or portal tracts; however, we found that only 1.68% of biopsies were defective for pathological diagnosis and these cases were excluded from the study. In any case, the pathologist had samples of acceptable quality

Table 4 Summary of area under the receiver operating characteristic curves (AUC-ROCs) of the HGM-3, HGM-2, HGM-1, FIB-4, aspartate aminotransferase to platelet ratio (APRI) and Forns' indexes

Index	AUC-ROC	95% CI		P-value
Significant fibrosis ($F \geq 2$)				
HGM-3	0.779	0.714	0.844	–
HGM-1	0.788	0.723	0.854	0.999
FIB-4	0.730	0.659	0.801	0.567
APRI	0.771	0.704	0.839	0.999
Forns'	0.732	0.661	0.803	0.647
Advanced fibrosis ($F \geq 3$)				
HGM-3	0.929	0.894	0.965	–
HGM-2	0.850	0.790	0.909	0.016
FIB-4	0.757	0.679	0.835	<0.001
APRI	0.772	0.698	0.846	<0.001
Forns'	0.759	0.683	0.834	<0.001
Cirrhosis (F4)				
HGM-3	0.931	0.891	0.970	–
HGM-2	0.917	0.875	0.958	0.495
FIB-4	0.815	0.726	0.904	0.007
APRI	0.798	0.721	0.875	<0.001
Forns'	0.815	0.734	0.895	0.008

AUC-ROC, area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval.

Table 5 Diagnostic accuracy and predictive values of the new index (HGM-3) for advanced fibrosis ($F \geq 3$) and cirrhosis (F4)

Cut-off	TP	FP	TN	FN	*Se (C195)	*Sp (C195)	*PPV (C195)	*NPV (C195)	LR + (C195)	LR – (C195)	DOR (C195)	*PCI (C195)
Estimation group ($n = 127$)												
0.135	41	27	57	2	95.3 (84.5, 98.7)	67.9 (57.3, 76.9)	60.3 (48.4, 71.1)	96.6 (88.5, 99.1)	2.97 (2.16, 4.08)	0.07 (0.02, 0.27)	43.28 (9.74, 192.29)	77.2 (69.1, 83.6)
0.570	31	5	79	12	72.1 (57.3, 83.3)	94 (86.8, 97.4)	86.1 (71.3, 93.9)	86.8 (78.4, 92.3)	12.11 (5.07, 28.91)	0.30 (0.18, 0.48)	40.82 (13.28, 125.47)	86.6 (79.6, 91.5)
Validation group ($n = 68$)												
0.135	17	16	34	1	94.4 (74.2, 99.0)	68.0 (54.2, 79.2)	51.5 (35.2, 67.5)	97.1 (85.5, 99.5)	2.95 (1.94, 4.49)	0.08 (0.01, 0.56)	36.13 (4.41, 295.75)	75.0 (63.6, 83.8)
0.570	10	3	47	8	55.6 (33.7, 75.4)	94.0 (83.8, 97.9)	76.9 (49.7, 91.8)	85.5 (73.8, 92.4)	9.26 (2.87, 29.9)	0.47 (0.28, 0.81)	19.58 (4.40, 87.08)	83.8 (73.3, 90.7)

CI, confidence interval; DOR, diagnostic odds ratio; FN, false negative cases (missed cases); FP, false positive cases (over-diagnosis); LR, likelihood ratio; NPV, negative predictive value; PCI, patients correctly identified; PPV, positive predictive value; Se, sensitivity; Sp, specificity; TN, true negative cases (correct diagnosis); TP, true positive cases (correct diagnosis).

*Values are given as percentage, with 95% confidence interval in parentheses.

to make a diagnosis of fibrosis for 98.32% of obtained biopsies.

In summary, we found that platelet count, ALP, HGF, TIMP-1 and HA were independent predictive markers of advanced fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. The combination of these indirect markers with direct markers of fibrosis in a logistic probability function yielded a new serum index that accurately predicted bridging fibrosis and cirrhosis. However, as with most models, HGM-3 better predicts the absence of fibrosis (97% certainty for $F < 3$ fibrosis) than the presence of significant fibrosis (77% certainty). HGM-3 improves upon the accuracy of other previously published indexes but still has limitations in accurately identifying patients with $F \geq 3$. This indicates that further research should be carried out to improve the ability to diagnose advanced fibrosis ($F \geq 3$) in HIV/HCV-coinfected patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) (Ref. 36650/07) and Instituto de Salud Carlos III (Ref. PI07/90201; Ref. UIPY 1467/07; PI08/0738) to SR and from FIS (Ref. ISCIII-RETIC RD06/006, PI08/0928) and FIPSE (Ref. 36443/03) to JB. DM is supported by a grant from Fundación Lair (grant 020907).

Financial disclosure

The authors do not have commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

References

- Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L *et al.* Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1–5.
- Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 1999; 30: 1054–1058.
- Bica I, McGovern B, Dhar R *et al.* Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 492–497.
- Graham CS, Baden LR, Yu E *et al.* Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 562–569.
- Garcia-Samaniego J, Rodriguez M, Berenguer J *et al.* Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 179–183.
- Yano M, Kumada H, Kage M *et al.* The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 1334–1340.
- Merchante N, Giron-Gonzalez JA, Gonzalez-Serrano M *et al.* Survival and prognostic factors of HIV-infected patients with HCV-related end-stage liver disease. *AIDS* 2006; 20: 49–57.
- Giron-Gonzalez JA, Brun F, Terron A, Vergara A, Arizcorreta A. Natural history of compensated and decompensated HCV-related cirrhosis in HIV-infected patients: a prospective multicentre study. *Antivir Ther* 2007; 12: 899–907.
- Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1670–1681.
- Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology* 2000; 32: 477–481.
- Regev A, Berho M, Jeffers LJ *et al.* Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2614–2618.
- Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449–1457.
- Saito H, Tada S, Nakamoto N *et al.* Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2004; 29: 97–103.
- Castera L, Vergniol J, Foucher J *et al.* Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343–350.
- Forns X, Ampurdanes S, Sanchez-Tapias JM *et al.* Long-term follow-up of chronic hepatitis C in patients diagnosed at a tertiary-care center. *J Hepatol* 2001; 35: 265–271.
- Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518–526.
- Sterling RK, Lissen E, Clumeck N *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 43: 1317–1325.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–419.
- Jacobs WH, Goldberg SB. Statement on outpatient percutaneous liver biopsy. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 322–323.
- Bedossa P, Poinard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289–293.
- Berenguer J, Bellon JM, Miralles P *et al.* Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. *J Viral Hepat* 2007; 14: 859–869.

- 22 DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; **44**: 837–845.
- 23 Song HH. Analysis of correlated ROC areas in diagnostic testing. *Biometrics* 1997; **53**: 370–382.
- 24 Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003; **56**: 1129–1135.
- 25 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; **115**: 209–218.
- 26 Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; **117**: 524–529.
- 27 Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006; **44**: 462–474.
- 28 Halfon P, Bacq Y, De Muret A *et al.* Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007; **46**: 395–402.
- 29 Larrousse M, Laguno M, Segarra M *et al.* Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; **46**: 304–311.
- 30 Kelleher TB, Mehta SH, Bhaskar R *et al.* Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA Index. *J Hepatol* 2005; **43**: 78–84.
- 31 Asano Y, Iimuro Y, Son G, Hirano T, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor promotes remodeling of murine liver fibrosis, accelerating recruitment of bone marrow-derived cells into the liver. *Hepatol Res* 2007; **37**: 1080–1094.
- 32 Lichtinghagen R, Bahr MJ. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; **4**: 715–726.
- 33 Thuluvath PJ, Krok KL. Noninvasive markers of fibrosis for longitudinal assessment of fibrosis in chronic liver disease: are they ready for prime time? *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 1981–1983.
- 34 Zeremski M, Talal AH. Noninvasive markers of hepatic fibrosis: are they ready for prime time in the management of HIV/HCV co-infected patients? *J Hepatol* 2005; **43**: 2–5.
- 35 Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F *et al.* Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004; **50**: 1344–1355.
- 36 Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004; **99**: 1160–1174.
- 37 de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A *et al.* Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **41**: 175–179.
- 38 Nunes D, Fleming C, Offner G *et al.* HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; **40**: 538–544.
- 39 Cacoub P, Carrat F, Bedossa P *et al.* Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study–ANRS HC02. *J Hepatol* 2008; **48**: 765–773.
- 40 Loko MA, Castera L, Dabis F *et al.* Validation and comparison of simple noninvasive indexes for predicting liver fibrosis in HIV-HCV-coinfected patients: ANRS CO3 Aquitaine Cohort. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 1973–1980.
- 41 Macias J, Giron-Gonzalez JA, Gonzalez-Serrano M *et al.* Prediction of liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients by simple non-invasive indexes. *Gut* 2006; **55**: 409–414.

6.3. Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 can predict virologic response to hepatitis C virus therapy in HIV/HCV-coinfected patients with HCV genotype 1.

Vargas A, Berenguer J, Ryan P, Catalán P, Lopez JC, Cosin J, Miralles P, Resino S. Plasma interferon- α -inducible protein-10 can predict virologic response to HCV therapy in HIV/HCV co-infected patients with HCV genotype 1. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010 Jun;54(2):219-20.

Antecedentes: Las quimiocinas son proteínas quimiotácticas que atraen a los leucocitos a los sitios de inflamación. IFN- γ -proteína inducible 10 (IP-10/CXCL10) es una quimiocina que puede tener un papel en el desarrollo de la inflamación crónica durante la infección por el VHC según lo sugerido por los elevados niveles de IP-10 en la sangre periférica y en el hígado en estudios previos.

Objetivo: Analizar la asociación entre los niveles plasmáticos basales de IP-10 y la respuesta virológica al tratamiento con interferón- α y Ribavirina (IFN- α + RBV) en pacientes coinfectados con VIH/VHC con el genotipo 1.

Diseño del estudio: Longitudinal retrospectivo.

Pacientes: Se realizó un estudio a 68 pacientes coinfectados con VIH/VHC del genotipo 1.

Métodos El IP-10 se midió utilizando el kit de Multiplex para el analizador Luminex 100™. Se utilizó una regresión logística para evaluar la asociación entre los niveles plasmáticos basales de IP-10 y la respuesta virológica en las semanas 12, 24, 48 y 72 después de comenzar la terapia del VHC.

Resultados: La respuesta virológica a las semanas 12, 24, 48 y 72 se logró en el 43%, 50%, 46% y 37% de los pacientes con genotipo 1, respectivamente. Los niveles plasmáticos de IP-10 antes de la terapia del VHC tuvieron valores más altos superiores en los pacientes no respondedores que en los pacientes con respuesta virológica en las semanas 12, 24, 48 y 72 ($p < 0,05$). Los pacientes con IP-10 < 1200 pg/mL tenían tasas de respuesta virológica mayor del 40% y los pacientes con IP-10 ≥ 1200 pg/mL tenían tasas de respuesta virológica por debajo del 20%. Por otra parte, hemos encontrado una asociación positiva entre los niveles plasmáticos basales de IP-10 < 1200 pg/mL y la respuesta virológica. Los pacientes con IP-10 < 1200 pg/mL tenían una odds ratio (OR) mayor de 4 para la respuesta virológica sostenida y una OR mayor de 7 para la respuesta virológica en las semanas 12, 24, y 48 después de comenzar la terapia del VHC.

Conclusiones: Los niveles plasmáticos de IP-10, antes de la terapia del VHC, pueden predecir la respuesta virológica a la terapia del VHC en pacientes VIH coinfectados con VHC de genotipo 1.

Plasma Interferon- γ -Inducible Protein-10 Can Predict Virologic Response to Hepatitis C Virus Therapy in HIV/HCV-Coinfected Patients With HCV Genotype 1

To the Editors:

The response rate to treatment for hepatitis C virus (HCV) infection with interferon- α (IFN- α) and ribavirin (RBV) has been associated with viral factors, host factors, and factors that might interfere with therapy.¹ IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) could play an important role in the pathogenesis of chronic HCV infection through the recruitment of effector Th1 lymphocytes to the liver parenchyma,² potentially contributing to the host immune response against the virus and to disease progression. Recently, serum IP-10 levels, before HCV therapy, have been associated with treatment response in HCV-infected patients.^{3–7} Only 2 reports were done in HIV/HCV-coinfected patients with a small number of patients and different HCV genotypes.^{6,7}

The aim of this study was to analyze the association between baseline plasma IP-10 levels and virologic response to IFN- α + RBV therapy in HIV/HCV-coinfected patients who harboured HCV genotype 1 (difficult-to-treat patients) in a retrospective study. Of 264 patients treated in our unit, we included 68 patients in an on-treatment analysis. Patients were treated for 48 weeks with the combination of IFN- α + RBV. For the purpose of this study, we excluded patients who; harboured HCV genotypes 2, 3, or 4, did not have a serum sample

taken at baseline, had previously received IFN- α + RBV, had received HCV treatment for less than 24 weeks or prematurely interrupted HCV treatment due to adverse events, abandonment, or loss of follow-up.

The HCV viral load was measured by polymerase chain reaction (Cobas Amplicor HCV Monitor Test, Branchburg, NJ) and results were reported in IU/mL. Virologic response was defined as an undetectable plasma HCV RNA level (<50 IU per milliliter). Virologic failure was defined as either failure to achieve a drop of 2 log₁₀ in HCV RNA from baseline levels at week 12 after initiation of therapy, detectable plasma HCV RNA level at week 24, or HCV viral rebound during therapy in subjects with prior undetectable viremia. To evaluate virologic response, we determined baseline plasma HCV RNA at weeks 12, 24, 48, and 72. Sustained virologic response (SVR) was defined as an undetectable plasma HCV RNA level at 24 weeks after the end of treatment.

A plasma sample before the initiation of IFN- α + RBV therapy was used to measure γ IP10 (CXCL10) using the Multiplex kit (Panomics Afymetrix, Inc; Procarta Protein Profiling Assays, Fremont, CA) and a Luminex 100 analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX).

Comparisons between groups were made using the *T* test according to Levene test for equality of variances for continuous variables and the χ^2 test or Fisher exact test for categorical variables. Multivariate logistic regression was used to evaluate the association between baseline IP-10 and virologic response (at weeks 12, 24, 48, and 72) to HCV therapy adjusted according to gender, age, insulin resistance, HCV viral load, nadir CD4 T-cell count, and advanced liver fibrosis (*F* \geq 3). Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software (SPSS INC, Chicago, IL).

The majority of the patients were male (75%), acquired HIV infection by intravenous drug use (82.4%), were on highly active antiretroviral therapy (82.4%), had a Metavir fibrosis stage of F2-F3 (72.4%), and had plasma HIV viral load <50 copies per milliliter (63.2%). Nine patients (13%) received standard interferon (IFN) and 59 (87%) received either 2a or 2b pegylated IFN.

Supported by grants from Fundaci3n para la Investigaci3n y la Prevenci3n del SIDA en Espa1a (Ref. 36650/07) and Instituto de Salud Carlos III (Ref. PI07/90201, Ref. UIPY 1467/07, Ref. PI08/0738) to S.R.; and from Fondo de Investigaci3n Sanitaria (Ref. ISCIII-RETIC RD06/006; Ref. PI08/0928) and Fundaci3n para la Investigaci3n y la Prevenci3n del SIDA en Espa1a (Ref. 36443/03; Ref. 36702/07) to J.B.

Plasma IP-10 values before anti-HCV therapy were higher among patients who did not achieve a virologic response than among those with virologic response at weeks 12, 24, 48, and 72, although at week 72, the difference was not significant ($P = 0.054$) (Fig. 1A).

Next, we selected a cut-off for IP-10 near the 75th percentile (1200 pg/mL). Patients with IP-10 <1200 pg/mL had higher rates of virologic response than patients with IP-10 ≥1200 pg/mL at weeks 12, 24, 48, and 72 after starting HCV therapy (Fig. 1B). Overall, patients

with IP-10 <1200 pg/mL had virologic response rates of ≥40%, and patients with IP-10 ≥1200 pg/mL had virologic response rates off less than 20%. Moreover, we found a positive association between plasma IP-10 levels that were <1200 pg/mL before HCV therapy and virologic responses at weeks 12, 24, 48, and 72 (Figure 1C). Patients with IP-10 <1200 pg/mL had an odds ratio >4 for SVR and odds ratio >7 for the other virologic responses during therapy at weeks 12, 24, and 48.

In our study, serum IP-10 was found to be a predictive marker of virologic response in difficult-to-treat HIV/HCV-coinfected patients. We found that baseline IP-10 levels before HCV therapy were significantly higher in non-responder patients at weeks 12, 24, 48, and 72 after starting treatment. Our study not only is in concordance with previous reports in HCV patients³⁻⁷ but provides additional information on virologic response rates during and after HCV therapy in difficult-to-treat HIV/HCV-coinfected patients with HCV genotype 1. Using an IP-10 cut-off of 1200 pg/mL, we found that IP-10 <1200 pg/mL before HCV-therapy was associated with virologic response to HCV-therapy.

IP-10 is the agonist of CXCR3 expressed in Th1 cells and is an antagonist of CCR3 expressed in Th2 cells. Therefore, IP-10 may be indirectly involved in the antiviral effect of therapy when HCV-infected hepatocytes secrete IP-10 and recruit mononuclear cells to the liver.⁸ IP-10 values found in HCV-infected patients with genotype 1 may also indicate a change in the IFN network. Greater IFN-stimulated gene induction in SVRs compared with non-responders after in vitro IFN stimulation of the liver has been reported.⁹ Furthermore, low response to HCV therapy indicates preactivation of the IFN system and results in some defects at steps downstream of IFN-sensitive gene (ISG) expression, making them refractory to both endogenous IFN-α and IFN-α therapy.⁹ IFN-α activates the Jak-STAT pathway, and most nonresponders had nuclear phospho-STAT1 already present in pretreatment biopsies, and ISG transcripts were seen to be up-regulated.⁹ The IP-10 gene is activated via the Jak-STAT pathway resulting in secretion of IP-10 by the cell. This could be the cause

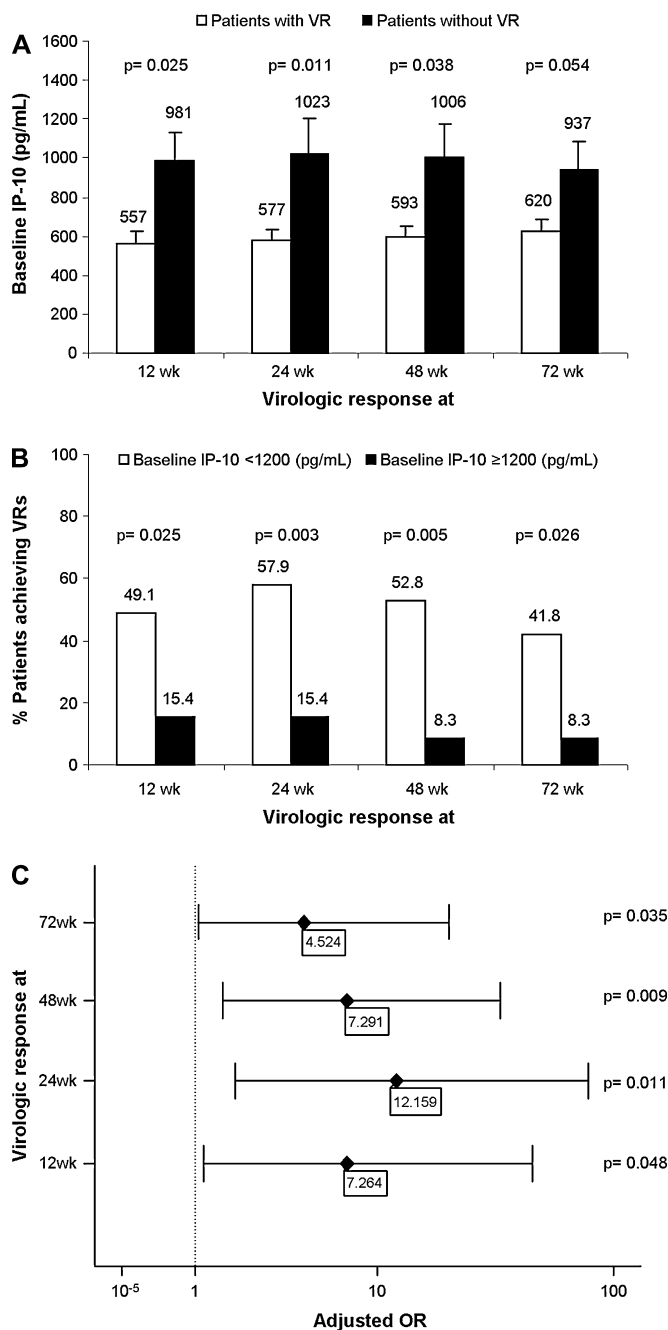


FIGURE 1. Summary of baseline IP-10 in HIV/HCV coinfecting patients according to virologic response to interferon plus RBV at weeks 12, 24, 48, and 72. A, baseline IP-10 values stratified by virologic response. B, virologic response rates stratified by baseline IP-10 < or ≥ 1200 pg/mL. C, Odds ratio between IP-10 <1200 pg/mL and virologic response to IFN plus RBV. VR, virologic response.

of why we and other authors have found elevated IP-10 in peripheral blood.

In conclusion, plasma IP-10 levels before HCV-therapy may predict virologic response during and after HCV-therapy in difficult-to-treat HIV/HCV-coinfected patients with genotype 1.

Ana Vargas, MSc*

Juan Berenguer, MD, PhD†

Pablo Ryan, MD†

Pilar Catalán, PharmD‡

Juan Carlos Lòpez, MD, PhD†

Jaime Cosín, MD, PhD†

Pilar Miralles, MD†

Salvador Resino, PhD*

*Laboratory of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

†Infectious Diseases-HIV Unit; Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, Madrid, Spain

‡Microbiology Department, Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, Madrid, Spain

REFERENCES

1. McGovern BH. Hepatitis C in the HIV-infected patient. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 45(Suppl 2):S47–S56. Discussion: S66–S47.
2. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2003; 74:360–369.
3. Lagging M, Romero AI, Westin J, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology*. 2006;44: 1617–1625.
4. Romero AI, Lagging M, Westin J, et al. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2006; 194:895–903.
5. Diago M, Castellano G, Garcia-Samaniego J, et al. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2006;55:374–379.
6. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther*. 2008;13:969–976.
7. Zeremski M, Markatou M, Brown QB, et al. Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 45:262–268.
8. Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology*. 2009;49:676–688.
9. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7034–7039.

ERRATUM

Characterization of Lymphomas in a High Prevalence HIV Setting: Erratum.

In the article by Mantina et al, appearing in the *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, Vol. 53, No. 5, pp. 656–660, entitled “Characterization of Lymphomas in a High Prevalence HIV Setting,” data in Table 1 was presented incorrectly, as the No. HIV+ and HIV-neg (135 and 34, respectively) were reversed.

REFERENCE

1. Mantina H, Wiggill TM, Carmona S, et al. Characterization of lymphomas in a high prevalence HIV setting. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53: 656–660.

6.4. Association between plasma levels of eotaxin (CCL-11) and treatment response to interferon-alpha and ribavirin in HIV/HCV co-infected patients.

Vargas A, Berenguer J, Catalán P, Miralles P, Lopez Juan C, Cosín J, Resino S. Association between plasma levels of eotaxin (CCL-11) and treatment response to interferon- α and ribavirin in HIV/HCV coinfecting patients. J Antimicrob Chemother. 2010 Feb;65(2):303-6.

Antecedentes: La Eotaxina (CCL-11), MCP-1 (CCL-2), y MCP-3 (CCL-7) son quimiocinas secretadas por el hígado durante la infección crónica por VHC. Los niveles de estas moléculas están fuertemente asociados con el reclutamiento de linfocitos, respuesta inmune y la fibrogénesis en el hígado.

Objetivo: Analizar la asociación entre los niveles basales plasmáticos de quimiocinas y la respuesta virológica al tratamiento con interferón- α (IFN- α) y ribavirina en pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la Hepatitis C (VHC).

Diseño del estudio: Longitudinal retrospectivo.

Pacientes: Se realizó un estudio en 109 pacientes coinfectados con VIH/VHC.

Métodos: Las quimiocinas se midieron utilizando el kit de ELISA Multiplex en un analizador Luminex 100™. Se utilizó un análisis de regresión logística para evaluar la asociación entre los niveles plasmáticos de quimiocinas antes de la terapia del VHC y la respuesta virológica a la semana 48 (respuesta al final del tratamiento (ETR)) y 72 (respuesta virológica sostenida (RVS)) después de iniciar la terapia contra el VHC.

Resultados: De todos los pacientes estudiados, se encontraron 57 pacientes con ETR. En los pacientes que alcanzan ETR, los niveles basales de eotaxina, MCP-1 y MCP-3 fueron más altas que los pacientes no respondedores (NR). Así mismo, 51 pacientes lograron una respuesta virológica sostenida (RVS). En estos pacientes, los niveles basales de eotaxina, MCP-1 y MCP-3 fueron más altos que los que no responden. Los niveles basales de eotaxina, MCP-1 y MCP-3 mostraron una asociación positiva y significativa con ETR, así como la eotaxina y MCP-1 con RVS. Sin embargo, después de ajustar la regresión logística, la eotaxina fue la única quimioquina capaz de predecir la ETR y RVS con unos valores de odds ratio (OR) de 1.016 (IC 95%: 1.004; 1.029) y 1.015 (IC del 95%: 1.002; 1.027) para ETR y RVS, respectivamente.

Conclusiones: Nuestros datos preliminares sugieren que los niveles plasmáticos de eotaxina, antes iniciar la terapia antiviral del VHC, pueden ser útiles para predecir la respuesta virológica al tratamiento del VHC con IFN- α y Ribavirina en pacientes coinfectados con VIH/VHC.

Association between plasma levels of eotaxin (CCL-11) and treatment response to interferon- α and ribavirin in HIV/HCV co-infected patients

Ana Vargas¹, Juan Berenguer², Pilar Catalán³, Pilar Miralles², Juan Carlos López², Jaime Cosín²
and Salvador Resino^{1*}

¹Laboratory of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain; ²Infectious Diseases–HIV Unit, Hospital General Universitario ‘Gregorio Marañón’, Madrid, Spain; ³Microbiology Department, Hospital General Universitario ‘Gregorio Marañón’, Madrid, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-918-223-266; Fax: +34-915-097-946; E-mail: sresino@isciii.es

Received 18 September 2009; returned 24 October 2009; revised 21 November 2009; accepted 23 November 2009

Objectives: To analyse the association between plasma chemokine levels at baseline and virological response to interferon- α (IFN- α) + ribavirin in human immunodeficiency virus (HIV)/hepatitis C virus (HCV) co-infected patients.

Methods: We carried out a retrospective study in 109 patients. Chemokines were measured using Multiplex kits using a Luminex 100 Analyzer. Logistic regression was used to evaluate the association between plasma chemokine levels before HCV therapy and virological response at weeks 48 and 72 after starting HCV therapy.

Results: Fifty-seven patients out of 103 achieved end of treatment virological response (ETR). In patients achieving ETR, the baseline levels of eotaxin, MCP-1 and MCP-3 were higher than non-responder (NR) patients. Similarly, 51 patients out of 106 achieved sustained virological response (SVR). In patients achieving SVR, the baseline levels of eotaxin and MCP-1 were higher than in NR patients. Plasma levels of eotaxin, MCP-1 and MCP-3 had a significant positive association with ETR, as well as eotaxin and MCP-1 with SVR. However, after stepwise multivariate logistic regression, eotaxin was the only chemokine selected capable of predicting ETR and SVR with odds ratio (OR) of 1.016 (95% CI: 1.004–1.029) and 1.015 (95% CI: 1.002–1.027) for ETR and SVR, respectively.

Conclusions: Our preliminary data suggest that plasma eotaxin levels prior to HCV antiviral therapy may be useful in predicting virological response to HCV treatment with IFN- α + ribavirin in HIV/HCV co-infected patients. Further experimental research is necessary to corroborate this hypothesis.

Keywords: Chemokines, antiviral therapy, prognostic marker, chronic hepatitis C, viral load, liver, inflammation, Th2 response

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) co-infected patients treated with interferon- α (IFN- α) and ribavirin have difficulty achieving sustained virological response (SVR).¹ Finding effective predictive markers of HCV virological response is one of the major challenges to increasing the effectiveness of HCV antiviral therapy. Chemokines play a role in regulating leucocyte recruitment and trafficking, acting primarily as chemoattractants and activators of specific types of leucocyte such as T cells (memory and activated T lymphocytes), which infiltrate the liver during chronic HCV infection.² Furthermore, chemokines may also be involved in liver regeneration, fibrosis and malignant transformation, which can be induced by the persistence of inflammation.³ Recently, attention has been focused

on determining the role of chemokines in response to IFN- α + ribavirin treatment during HCV infection.^{4,5} The aim of our study was to analyse the association between plasma chemokine levels before HCV antiviral therapy and treatment response to IFN- α + ribavirin in HIV/HCV co-infected patients.

Patients and methods

We carried out a retrospective study between July 2000 and February 2009. The eligibility criteria for anti-HCV therapy included the absence of prior hepatic decompensation, CD4+ T cell count > 200 cells/mm³, stable antiretroviral therapy or no need for antiretroviral therapy, the absence of active opportunistic infections and no active drug addiction. For the purpose of this study, we excluded patients who did not have a serum sample taken at baseline, had previously received IFN- α + ribavirin,

had diabetes mellitus, had received HCV treatment for <24 weeks or had their HCV treatment prematurely interrupted due to adverse events, abandonment or loss of follow-up.

During the study period, 264 HIV/HCV co-infected patients from our institution were treated for HCV infection with IFN- α + ribavirin. A total of 137 patients each had a plasma sample collected and frozen before initiation of IFN/ribavirin therapy, of which 28 (17%) had the treatment prematurely interrupted due to adverse events, abandonment or loss of follow-up. All patients gave their written consent for the liver biopsy and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Patients were treated for 48 weeks with the combination of IFN- α + ribavirin. Three types of IFN were used: standard non-pegylated IFN- α -2b (Intron-A; Schering-Plough, Alcobendas, Madrid) at a dose of 3 million units (MU) three times per week; pegylated-IFN- α -2a (Pegasys; Roche Farma S.A., Madrid) at a dose of 180 μ g per week; or pegylated-IFN- α -2b (Peg-Intron; Schering-Plough, Alcobendas, Madrid) at a dose of 1.5 μ g/kg per week. All patients received ribavirin (Rebetol; Schering-Plough, Alcobendas, Madrid) at a dose of 800–1200 mg per day according to body weight. Anti-HCV therapy was stopped in all patients with detectable HCV-RNA at week 24 of treatment. Since 2003, we have applied the so-called '2-log stopping rule'; i.e. discontinuation of therapy in patients with detectable HCV-RNA at week 12 of treatment with a reduction of <2 log IU/mL in HCV-RNA.

Medical records were used to obtain information such as age, gender, risk category, CDC clinical category, prior and current antiretroviral therapy and nadir CD4+ T cell count. Before the initiation of IFN + ribavirin therapy, liver biopsies were performed as previously described.⁶ Grading and staging of liver biopsies were carried out by METAVIR score.⁷ In addition, a blood sample was taken from each patient to analyse complete blood counts, liver panel, basic metabolic panel and coagulation tests. A serum sample was immediately stored and frozen (at -70°C) for further assays.

HCV genotype was determined by hybridization of biotin-labelled PCR products to oligonucleotide probes bound to nitrocellulose membrane strips (INNO-LiPA HCV II; Innogenetics, Ghent, Belgium). The HCV viral load was measured by PCR (Cobas Amplicor HCV Monitor Test; Roche, Branchburg, NJ, USA) and the results were reported in IU/mL.

The plasma chemokines eotaxin (CCL11), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2), MCP-3 (CCL7), GRO- α (CXCL1) and epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78 or CXCL5) were measured using Multiplex kits (Procarta Protein Profiling Assays; Panomics Afymetrix, Inc., Fremont, CA, USA). The Multiplex suspension bead array immunoassay was performed using a Luminex 100 Analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) to identify plasma protein levels in frozen plasma samples according to the manufacturer's specifications.

The degree of insulin resistance (IR) was estimated by the homeostatic model assessment (HOMA) score, which was obtained with the formula: fasting plasma glucose (mmol/L) times fasting serum insulin (milliunits per litre; mU/L) divided by 22.5. As in other studies, IR was considered to be altered when the HOMA-IR score was ≥ 3.8 .

For the assessment of the association between plasma chemokine levels and end of treatment virological response (ETR) or SVR after IFN- α + ribavirin therapy, we excluded patients from the analysis that had their HCV treatment prematurely interrupted due to adverse events, abandonment or loss of follow-up. The statistical analysis was carried out by on-treatment (OT) analysis of observed data. This analysis provided results only for patients for whom follow-up data were available; missing values were disregarded.

The outcome variables were: (i) ETR, defined as an undetectable plasma HCV-RNA level (<50 IU/mL) at week 48 (the end of treatment); and (ii) SVR, defined as an undetectable plasma HCV-RNA level at 24 weeks after the end of treatment. A non-responder (NR) to treatment was defined as a patient with detectable plasma HCV-RNA at the end of treatment or at 24 weeks after the end of treatment. The absolute numbers and percentages of virological response patients did not

necessarily reflect the total number of patients in the study, because of the absence of certain data for these variables at the end of treatment or at 24 weeks after the end of treatment.

All tests were two-tailed with P values <0.05 considered to be significant. Statistical analysis was performed by SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Categorical data and proportions were analysed using the χ^2 test or Fisher's exact test as required. The Mann-Whitney test was used to compare variables with non-normal distribution.

Univariate logistic regression was used to evaluate the association of clinical and epidemiological characteristics with ETR and SVR. Next, we selected variables that had a significant influence ($P < 0.2$) on virological response in our cohort (HOMA, HCV genotype 1 or 4, nadir CD4+ and ribavirin dose) to adjust a multivariate logistic regression to evaluate the association of plasma chemokines with ETR and SVR. We also used a stepwise logistic regression to select the most relevant chemokine and the highest predictive value of HCV antiviral therapy response.

Results

The OT analysis involved 109 patients whose baseline characteristics are shown in Table 1. We did not find any correlation of CC-chemokines [eotaxin (CCL11), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7)], CXC-chemokines [GRO- α (CXCL1)] or ENA-78 (CXCL5) with fibrosis scores.

We analysed the association of several clinical and epidemiological characteristics [age, gender, injection drug use, nadir CD4+ (cells/mm³), HIV-RNA <50 copies/mL, CD4+ (cells/mm³), significant fibrosis ($F \geq 2$), advanced fibrosis ($F \geq 3$), HOMA, HCV genotype 1 or 4, ribavirin dose (mg/kg/day), log₁₀ HCV-RNA (IU/mL)] with ETR and SVR by univariate logistic regression and we found HCV genotype 1 or 4 [OR: 2.319 (95% CI: 1.437–3.744); $P < 0.001$] and nadir CD4+ [OR: 1.003 (95% CI: 1.001–1.005); $P < 0.05$] had positive associations with ETR. We also found HCV genotype 1 or 4 [OR: 2.571 (95% CI: 1.615–4.092); $P < 0.001$] and nadir CD4+ [OR: 1.003 (95% CI: 1.001–1.006); $P < 0.05$] had positive associations with SVR. We found that HOMA and ribavirin dose had slight positive associations with ETR and SVR ($P < 0.2$).

We evaluated baseline plasma chemokine levels according to HCV antiviral therapy response (Table 2). Fifty-seven patients out of 103 achieved ETR. In patients achieving ETR, the baseline levels of eotaxin, MCP-1 and MCP-3 were higher than in NR patients. Similarly, 51 patients out of 106 achieved SVR. In patients achieving SVR, the baseline levels of eotaxin and MCP-1 were higher than in NR patients. In multivariate logistic regression, we found that plasma levels of eotaxin, MCP-1 and MCP-3 had a significant positive association with ETR, as well as eotaxin and MCP-1 with SVR (Table 2). After stepwise multivariate logistic regression, eotaxin was the only chemokine selected capable of predicting ETR and SVR with the values shown in Table 2.

Discussion

The selection of candidates for HCV treatment is especially important in HIV/HCV co-infected patients and the identification of predictive markers of virological response can help physicians optimize anti-HCV therapy. We identified an association between the baseline levels of eotaxin (CCL11) and virological response to IFN- α + ribavirin in HIV/HCV co-infected patients. More specifically, HIV/HCV co-infected patients with higher plasma eotaxin

Table 1. Baseline characteristics of 109 HIV/HCV co-infected patients

Characteristics	Values
No. of HIV patients	109
Gender (male)	86 (78.9)
Age (years)	40.7±0.5
Injection drug users	97 (89)
CDC category C	58 (53.2)
High alcohol intake ^a	57 (52.3)
Metabolic markers	
BMI ^b	22.8±0.3
insulin (pg/mL) ^c	19.8±2.5
HOMA-IR ^d	4.7±0.6
insulin resistance ^e	39 (35.8)
METAVIR (n=95)	
significant fibrosis (F≥2)	78 (82.1)
advanced fibrosis (F≥3)	37 (38.9)
cirrhosis (F4)	11 (10.1)
ALT (IU/L)	96.6±6.5
ALT≥110 IU/L	20 (18.3)
Viral markers	
nadir CD4+ (cells/mm ³) ^f	236±16.4
CD4+ (cells/mm ³)	512.6±25.2
HIV-RNA <50 copies/mL	73 (67)
HCV genotype 1 or 4	73 (67)
log ₁₀ HCV-RNA (IU/mL)	5.77±0.06
HCV-RNA >500 000 IU/mL	59 (54.1)
Antiviral therapy	
HAART	92 (84.4)
HCV therapy—pegylated-IFN-α+RBV	89 (81.7)
RBV >1200 mg/kg/day	14 (12.8)

HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; HCV-RNA, HCV plasma viral load; HIV-RNA, HIV plasma viral load; ALT, alanine aminotransferase; IFN-α, interferon-α; RBV, ribavirin; HAART, highly active antiretroviral therapy; BMI, body mass index; HOMA-IR, degree of insulin resistance estimated by the homeostatic model assessment score.

The absolute numbers and percentages may not reflect the total number of patients because of the absence of certain data for these variables. Categorical variables are expressed as absolute numbers (%) and continuous variables as means and standard errors of the mean.

^aThe consumption of >50 g of alcohol per day for at least 12 months.

^bBMI was calculated as the weight in kg divided by the square of the height in metres.

^cAfter an overnight fast and before the initiation of therapy, a plasma sample was taken from the patient to be analysed.

^dHOMA-IR, fasting plasma glucose (mmol/L) times fasting plasma insulin (mU/L) divided by 22.5.

^eInsulin resistance was defined when the HOMA-IR index was 3.8 or higher.

^fNadir CD4+ T cell counts were defined as the historically lowest measured CD4+ T cell count.

Table 2. Plasma chemokines and HCV antiviral response in 109 HIV/HCV co-infected patients

	ETR				SVR			
	NR ^a	ETR ^a	P*	OR (95% CI)	P*	SVR ^a	OR (95% CI)	P**
No. (%) ^b	46/103 (44.6)	57/103 (55.3)	—	—	—	51/106 (48.1)	—	—
GRO-α (pg/mL)	57.8 (0.96; 286.2)	73.8 (4.9; 210.3)	0.308	1.007 (0.995–1.019)	0.240	73.8 (4.9; 210.3)	1.007 (0.995; 1.018)	0.254
MCP-1 (pg/mL)	23.1 (1.7; 200.1)	38.1 (2.1; 183.3)	0.006	1.013 (1.002–1.024)	0.023	35.9 (2.1; 183.3)	1.010 (1.000; 1.020)	0.041
MCP-3 (pg/mL)	10.4 (0.5; 43.8)	17.9 (1.6; 80)	0.019	1.047 (1.005–1.091)	0.027	14.9 (1.6; 49.3)	1.012 (0.978; 1.046)	0.496
ENA-78 (pg/mL)	92.1 (0.8; 360.6)	87.6 (0.6; 386.3)	0.598	0.999 (0.994; 1.004)	0.717	88.8 (0.6; 386.3)	1.001 (0.996; 1.006)	0.666
Eotaxin (pg/mL)	33.4 (2.2; 166.1)	67.4 (1.4; 222.4)	0.003	1.016 (1.004–1.029)	0.011	64.5 (1.4; 222.4)	1.015 (1.002; 1.027)	0.019

NR, non-responder; ETR, end of treatment virological response; SVR, sustained virological response; OR, odds ratio; 95% CI, confidence interval of 95%; P value, level of statistical significance. Italic text indicates significant P values.

^aValues expressed as median (minimum; maximum).

^bThe absolute numbers and percentages may not reflect the total number of patients because of the absence of certain data for these variables.

*The Mann–Whitney test was used to derive P values.

**The statistical test used to derive P values was multivariate logistic regression that was adjusted by variables that had a significant influence on virological response in our cohort (HOMA, HCV genotype 1 or 4, nadir CD4+ and dose of ribavirin).

levels had the highest virological response (ETR and SVR) rates. This finding was further confirmed by multivariate analysis. This article is the first report describing eotaxin as a predictive marker of virological response to IFN- α +ribavirin in HIV/HCV co-infected patients.

Chemokines cooperate with pro-fibrotic cytokines (such as interleukin-13 and transforming growth factor- β) in the development of fibrosis, and the CC-chemokine family has been shown to play an important regulatory role in this process.⁸ Eotaxin (CCL-11), MCP-1 (CCL-2) and MCP-3 (CCL-7) are secreted by the liver during chronic HCV infection, and levels are strongly associated with lymphocyte recruitment, immune response and fibrogenesis.² However, we did not find any correlation between these CC-chemokines and fibrosis scores. Eotaxin is a chemokine that is thought to selectively attract eosinophils, basophils and Th2 lymphocytes through CCR3.⁹ MCP-3 is a potent agonist for CCR1, CCR2 and CCR3, and thus blocks Th1 cell function.⁹ MCP-1 is a potent agonist for CCR2, and therefore participates in regulating lymphocyte subset infiltration by plasmacytoid dendritic cells, macrophages and memory T cells, which are enriched in the HCV-infected liver.¹⁰ These chemokines may reflect the degree of local chemokine signalling intended to recruit CCR2+ and CCR3+ lymphocytes during inflammation or Th2 immune response.² Under this scenario, we believe that patients with an increased Th2 profile could benefit more highly from HCV treatment, because the elevated levels of eotaxin may indicate a healthy Th1 immune response and low preactivation of their IFN system, making them more responsive to IFN- α therapy.

IFN- α increases the number of IFN- γ -producing CD4+ T cells, and it may favour the induction and maintenance of Th1-like cells and thereby counteract Th2-driven immune response against the HCV.¹¹ However, a potent Th1 immune response unable to eliminate the HCV during chronic HCV infection may indicate an impaired Th1 immune response that would make it difficult to achieve an effective virological response to IFN- α +ribavirin.^{12,13} A previous report showed that elevated levels of cytokines stimulated by IFN existed in NR patients.¹⁴ Sarasin-Filipowicz et al.¹³ reported that patients that responded poorly to therapy show preactivation of their IFN system and have some defects at steps downstream of ISG expression, making them refractory to both endogenous IFN- α and IFN- α therapy.

Our study has several limitations: (i) the low number of patients; (ii) it is a retrospective study; and (iii) it was limited to patients with well-preserved immune function. Extrapolation to individuals with more marked immune suppression will require further study. In spite of its limitations, our preliminary data suggest that plasma eotaxin levels prior to HCV antiviral therapy may be useful in predicting virological response to HCV treatment with IFN- α +ribavirin in HIV/HCV co-infected patients. Further experimental research is necessary to corroborate this hypothesis.

Acknowledgements

We wish to thank Silvia Moreno for her excellent technical assistance.

Funding

This work was supported by grants from Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) (grant number 36650/07) and Instituto de Salud Carlos III (grant number PI07/90201, PI08/0738, UIPY 1467/07) to S. R., and from Instituto de Salud Carlos III (grant number ISCIII-RETIC RD06/006, PI08/0928) and FIPSE (grant number 36443/03) to J. B.

Transparency declarations

We do not have any commercial or other association that might pose a conflict of interest.

References

- 1 Pol S, Soriano V. Management of chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2008; **47**: 94–101.
- 2 Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology* 2009; **49**: 676–88.
- 3 Wald O, Weiss ID, Galun E et al. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007; **39**: 50–62.
- 4 Romero AI, Lagging M, Westin J et al. Interferon (IFN)- γ -inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN- α 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006; **194**: 895–903.
- 5 Diago M, Castellano G, Garcia-Samaniego J et al. Association of pretreatment serum interferon γ inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2006; **55**: 374–9.
- 6 Berenguer J, Bellon JM, Miralles P et al. Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. *J Viral Hepat* 2007; **14**: 859–69.
- 7 Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; **24**: 289–93.
- 8 Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 583–94.
- 9 Moser B, Wolf M, Walz A et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; **25**: 75–84.
- 10 Leroy V, Vigan I, Mosnier JF et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; **38**: 829–41.
- 11 Davis AM, Hagan KA, Matthews LA et al. Blockade of virus infection by human CD4+ T cells via a cytokine relay network. *J Immunol* 2008; **180**: 6923–32.
- 12 Younossi ZM, Baranova A, Afendy A et al. Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin. *Hepatology* 2009; **49**: 763–74.
- 13 Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 7034–9.
- 14 Polyak SJ. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis* 2003; **7**: 67–88.

Discusión

7. Discusión

7.1. Métodos no invasivos para el diagnóstico de fibrosis y cirrosis hepática en pacientes coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana y el virus de hepatitis C (VHC).

7.1.1. Evaluación del Ácido Hialurónico.

La fibrosis hepática se considera un proceso dinámico caracterizado por la remodelación de la matriz y la deposición excesiva de proteínas de la MEC incluyendo colágeno [167, 247, 248]. Actualmente, se utilizan dos tipos de marcadores séricos de fibrosis hepática: marcadores indirectos que reflejan alteraciones en la función hepática, pero no reflejan directamente el metabolismo de ECM (es decir, recuento de plaquetas, estudios de coagulación, etc.), y marcadores directos que reflejan cambios cualitativos y cuantitativos en macromoléculas de ECM [176]. Uno de estos marcadores indirectos es el HA, el cual ha sido descrito como un componente de varios índices no invasivos de fibrosis o como un único parámetro para la evaluación no invasiva de la fibrosis/cirrosis en pacientes infectados por VHC [172, 239].

En este primer estudio se analizó exclusivamente el HA, encontrándose que los niveles de HA en suero se relacionaron directamente con los estadios de la fibrosis hepática. Por otra parte, el AUC-ROC para el diagnóstico de fibrosis aumentó según aumentaba el estadio de fibrosis a determinar, con el mayor valor de AUC-ROC para la cirrosis. El HA fue moderadamente preciso en el diagnóstico de fibrosis significativa ($F \geq 2$) (AUC-ROC de 0,676), mientras que fue un método más preciso para la detección de la cirrosis (AUC-ROC de 0,863). Además, el VPN fue del 99%, lo que podría ser aceptable para la exclusión de la cirrosis. Sin embargo, el VPP fue sólo el 55%, lo cual es inaceptable para el diagnóstico de la cirrosis, aunque este valor puede ser explicado por el bajo número de pacientes cirróticos en nuestra cohorte. Naturalmente, descartar la cirrosis es de menor importancia en el manejo de los pacientes que confirmar un diagnóstico. Según todos los datos disponibles, el interés práctico de la utilización aislada de HA para evaluar la fibrosis hepática en pacientes VIH / VHC coinfectados en la práctica clínica parece ser bastante baja.

Muchos expertos creen que las pruebas no invasivas actuales para diagnosticar la fibrosis hepática aún no pueden sustituir a las biopsias de hígado [249-252]. Sin embargo, el diagnóstico por biopsias de hígado también acumula errores e imprecisiones debidas a la toma de muestra y a la interpretación de la biopsia por parte del patólogo; errores que no afectan a los índices no

invasivos [253]. Por ello, algunos expertos consideran que las pruebas no invasivas deben alcanzar valores del AUC-ROC de 0,85 y hasta 0,90, para llegar a ser tan buena como una biopsia de hígado para la estadificación de la fibrosis [254], pero sería imposible llegar a alcanzar valores de AUC-ROC de 1. Por otro lado, algunos autores han argumentado que algunos marcadores no invasivos de fibrosis podrían ser aún más preciso que las biopsias, y que la mayoría de los resultados significativamente discordantes entre biopsias y pruebas no invasivas pueden ser debido al método de obtención de biopsias que no muestra el estado real de fibrosis hígado (error de muestreo al realizar las biopsias) [253]. Así, hay expertos en fibrosis hepática que considerarían que las pruebas no invasivas para diagnosticar la fibrosis pueden ser tan precisas como las biopsias hepáticas para el diagnosticar la fibrosis [254].

En este estudio, el rendimiento diagnóstico de HA fue similar a los índices de Forns, APRI, FIB-4, HGM-1 y HGM-2 para los pacientes coinfectados VIH/VHC. También se encontró que el AUC-ROC del HA fue similar a los valores de AUC-ROC de APRI, FIB-4 e índice de Forns obtenidos por otros autores en pacientes coinfectados VIH/VHC [255-259], pero más bajas que las AUC-ROC de APRI, FIB-4 e índice de Forns obtenidos en otros estudios llevados a cabo en pacientes monoinfectados por VHC [187, 188, 260]. En resumen, de acuerdo con nuestros datos, el rendimiento de HA no es mejor que el de otros índices no invasivos comunes que utilizan parámetros fácilmente disponibles en la práctica clínica habitual de pacientes coinfectados VIH/VHC. Además, a pesar de que HA es una sola molécula, su cuantificación no se mide comúnmente en los hospitales, no se puede obtener a partir de datos clínicos normales, y por tanto es más caro y complicado de obtener.

La ventaja de HA en los otros índices no invasivos simples (APRI, FIB-4, HGM-1 y HGM-2) es que estos índices podrían verse afectados por algunos factores asociados con la infección por VIH, tales como anormalidades bioquímicas y hematológicas y la terapia antirretroviral [261-263], que puede conducir a un aumento de las transaminasas o de colesterol en la sangre [261-263]. Esta terapia antirretroviral ha incrementado la incidencia de trastornos metabólicos importantes que producen manifestaciones clínicas que tienen un impacto en el futuro de la salud del paciente infectado por el VIH, incluyendo la hiperlipidemia, lipodistrofia, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 [264, 265]. Por otra parte, la hepatotoxicidad es una complicación grave en pacientes que toman TARGA y la coinfección con el VHC aumenta el riesgo de toxicidad en el hígado mientras está tomando la terapia antirretroviral [261, 262]. La evidencia de disfunción hepática grave (coagulopatía o la elevación de los niveles de amoníaco) es sugerente de toxicidad grave y la TARGA debe suspenderse. Sin embargo, los índices

simples (APRI, FIB-4, HGM-1 y HGM-2) se calculan de una manera relativamente fácil con estos parámetros fácilmente disponibles en la práctica clínica.

Por otra parte, se utilizó una prueba de HA-ELISA (Echelon Biosciences), que a pesar de que es válida, ofrece resultados diferentes a otros test de ELISA del mercado que han sido utilizado en otros artículos, como el Test Kit de Corgenix (Westminster, CO, USA) y el de Pharmacia (Uppsala, Sweden) [181, 266-271]. El HA-ELISA (Echelon Biosciences) no ha sido previamente informado como una prueba de fibrosis. Por lo tanto, este trabajo es un estudio de validación de la prueba de HA-ELISA (Echelon Biosciences), aunque los niveles de HA en este estudio son bastante diferentes (alrededor de 10 veces más grande) de los informados previamente en pacientes con VHC o VIH/VHC [181, 267-271].

7.1.2. Índice no invasivo compuesto: HGM3.

El HA ha demostrado su utilidad cuando se utiliza en combinación con otros parámetros para formar índices no invasivos compuestos útiles en pacientes monoinfectados por VIH y coinfectados por el VIH/VHC [239, 272].

En el segundo estudio, el objetivo fue el desarrollo de un índice no invasivo para identificar la fibrosis hepática avanzada en una serie de 195 pacientes coinfectados VIH/VHC. Los pacientes se dividieron al azar en un grupo de estimación y otro grupo de validación. Se evaluaron los datos de laboratorio, así como los marcadores del metabolismo de la matriz extracelular (ECM), inflamación, factores de crecimiento, y la resistencia a la insulina. En el grupo de valoración, análisis univariante reveló que el recuento de plaquetas, ALP, HGF, TIMP-1 y HA se asociaron con la fibrosis hepática avanzada. Con estos marcadores, hemos desarrollado un nuevo índice a través de una función de probabilidad logística que hemos denominado HGM-3. No hemos incluido "Tiempo en TARGA" en el modelo final debido a que el modelo con y sin "Tiempo en TARGA" no tuvo diferencias significativas. Por otra parte, muchas veces es difícil calcular el tiempo de la TARGA en los pacientes que pueden cambiar de centro de referencia en varias ocasiones o la historia clínica es incompleta. HGM-3 tuvo un AUC-ROC para la identificación de la fibrosis hepática avanzada mayor de 0,90, y fue significativamente mayor que la AUC-ROC obtenido con HGM-2, FIB-4, APRI, o el índice de Forns. Estos resultados confirman que HGM-3 es un método no invasivo útil para la detección fibrosis avanzada/cirrosis en pacientes co-infectados por el VIH / VHC.

En este estudio, se evaluó una gran variedad de marcadores indirectos estándar de la fibrosis hepática. En el análisis multivariante, se encontró que el recuento de plaquetas y ALP fueron

marcadores predictivos independientes de fibrosis avanzada. Nuestros hallazgos se hicieron eco de los resultados de muchos estudios anteriores que mostraron que el recuento de plaquetas y los niveles de ALP fueron predictores importantes de la fibrosis significativa o la cirrosis [252]. Entre los marcadores directos de la fibrosis hepática se encontró una buena asociación entre los niveles séricos de TIMP-1 y HA con la fibrosis avanzada. Ambos marcadores mostraron un excelente valor predictivo de fibrosis avanzada, lo que confirma los resultados de otros estudios [184, 270, 273]. Sin embargo, en este estudio, otros marcadores no mostraron ningún valor predictivo para la fibrosis avanzada. Estos marcadores consistieron de indicadores de remodelación de la matriz tales como la MMP-1, MMP-2, e YKL-40, así como varias moléculas relacionadas con la regulación del metabolismo (leptina, insulina, y factor de crecimiento nervioso) y la inflamación (sICAM, sVCAM, sFas, sLFas y FOMIN).

También se encontró que el HGF fue un buen marcador predictivo de la fibrosis hepática avanzada. Este es el primer estudio que muestra que los niveles séricos de HGF predicen fibrosis hepática avanzada en pacientes con hepatitis crónica C. HGF es un factor paracrino de crecimiento celular, motilidad y morfogénesis. HGF es secretado por las células mesenquimales y actúa principalmente sobre las células epiteliales y endoteliales, y también sobre las células progenitoras hematopoyéticas. Se ha demostrado que tiene un papel importante en el desarrollo de órganos embrionarios, en la regeneración de órganos adulto y en la cicatrización de heridas. Los niveles séricos de HGF están fuertemente asociados con las enfermedades del hígado, la obesidad, la resistencia a la insulina y síndrome metabólico [274]. Es posible que los niveles elevados de HGF reflejen daño hepático significativo o, alternativamente, un desequilibrio entre el aclaramiento de HGF y la producción de lo que podría ser un indicador de la disfunción del hígado porque el hígado es el principal órgano a través del cual el HGF se elimina de la circulación sistémica.

En este estudio, el AUC-ROC de HGM-3 para la detección de fibrosis avanzada fue mayor de 0,90 un valor de precisión que no se ha logrado previamente con otros índices en pacientes co-infectados por el VIH/VHC [184, 267, 275]. Por otra parte, encontramos que HGM-3 tuvo una mayor precisión diagnóstica que HGM-2, APRI, FIB-4, o el índice de Forns [186, 188, 276, 277]. Es importante señalar que la muestra de estudio es un subgrupo de pacientes incluidos en un informe previo en el que se estimó el índice HGM-2 [186], y se encontró que la HGM-3 era más preciso que el índice HGM-2 para diagnosticar la fibrosis avanzada.

Los paneles no invasivos como APRI, FIB-4, e índice de Forns son muy baratos y ampliamente disponibles, pero son relativamente imprecisos en el diagnóstico de fibrosis en los pacientes coinfectados por VIH/VHC [256, 257, 259]. El modelo HGM-3 contiene algunas pruebas que no son de rutina y que no son ampliamente accesible y probablemente costosas, lo que hace menos atractivo el modelo HGM-3 ya que no sería accesible para la mayoría de los médicos. Sin embargo, en la actualidad, estas moléculas pueden medirse utilizando ensayos de ELISA multiplex de una forma rápida y barata.

HGM-3 también tuvo buenos resultados para el diagnóstico de cirrosis, pero encontramos los valores AUC-ROC similares a HGM-2. Creemos que HGM-3 es menos útil para el diagnóstico de cirrosis o, ya HGM-2 se calcula a partir de marcadores indirectos asociados con la fibrosis que se obtienen de la rutina clínica y que están ampliamente disponibles y son muy barato [186]. Por otra parte, no fue posible evaluar la precisión diagnóstica en los grupos de estimación y validación debido al bajo número de pacientes con cirrosis incluidos en este estudio.

En resumen, encontramos que la cifra de plaquetas, ALP, HGF, TIMP-1 y HA fueron marcadores predictivos independientes de fibrosis avanzada en los pacientes coinfectados por VIH/VHC. La combinación de estos marcadores de fibrosis en una función de probabilidad logística condujo a un nuevo índice no-invasivo con buen rendimiento para el diagnóstico de fibrosis avanzada/cirrosis. Sin embargo, como con la mayoría de modelos, HGM-3 predice mejor la ausencia de fibrosis (97% de certeza para $F < 3$) que la presencia de fibrosis significativa (77% de certeza). HGM-3 mejora la precisión de otros índices publicados anteriormente, pero aún tiene limitaciones en la identificación precisa de los pacientes con $F \geq 3$. Esto indica que la investigación adicional debe llevarse a cabo para mejorar la capacidad de diagnóstico de los pacientes coinfectados VIH/VHC con fibrosis avanzada ($F \geq 3$).

El análisis del rendimiento diagnóstico en nuestra cohorte tenía varias limitaciones: a) el bajo número de pacientes, b) el este estudio se realizó en pacientes con la función inmune bien conservado y la extrapolación a las personas con inmunosupresión más marcada requeriría más estudio; c) no se puede comparar directamente con otros índices como Shasta, Fibrotest, Hepascore o Fibrometer porque no tenemos todas las variables clínicas de rutina necesarias para calcular estos índices; y aunque dispusiéramos de dichos valores, d) no podemos dar información exacta sobre la longitud de la biopsia, pero sólo el 1,68% de las biopsias fueron defectuosas para el diagnóstico patológico, y estos casos fueron excluidos de este estudio; e) sólo un patólogo interpretó las biopsias no fueron validados por otra persona; f) la distribución

desigual de los estadios de fibrosis en nuestra cohorte que tiene una baja proporción de pacientes en estadios F0 y F4.

7.2. Biomarcadores predictivos de respuesta virológica al tratamiento con interferón- α y ribavirina en pacientes coinfectados con VIH / VHC: el interferón γ -proteína inducible-10 (IP-10) y Eotaxina.

En los dos últimos artículos de la tesis, el objetivo fue analizar la asociación entre los niveles plasmáticos de quimiocinas y la respuesta al tratamiento antiviral frente al VHC en pacientes coinfectados por el VIH/VHC.

7.2.1. interferón γ -proteína inducible-10 (IP-10).

El objetivo de la terapia contra el VHC es alcanzar la RVS pero diferentes tasas de RVS se han informado en la literatura en función del genotipo [278]. Los pacientes con genotipo 1 se consideran difíciles de tratar debido a su baja tasa de respuesta al tratamiento [229]. En el tercer estudio, los valores de IP-10 resultaron ser un marcador predictivo de respuesta virológica en los pacientes co-infectados VIH/VHC difíciles de tratar. Así, los niveles basales de IP-10 antes de la terapia del VHC fueron significativamente mayores en pacientes no respondedores en las semanas 12, 24, 48, y 72 después de iniciar el tratamiento. Nuestro estudio no sólo está en concordancia con los informes anteriores en pacientes con VHC [279-283], sino que también proporciona información adicional sobre las tasas de respuesta virológica durante y después de la terapia contra el VHC en los pacientes co-infectados VIH/VHC difíciles de tratar con el VHC genotipo 1. Con el punto de corte de IP-10 en 1200 pg/ml se encontró que IP-10 <1200 pg/ml antes del tratamiento del VHC se asoció con una respuesta virológica eficaz al tratamiento. Por tanto, IP-10 podría aportar información importante para la selección de candidatos para el tratamiento del VHC en este grupo de pacientes, pudiendo ayudar a los médicos optimizar el tratamiento anti-VHC.

Hay quimiocinas con actividad agonista y antagonista para el control de la migración de leucocitos [284]. IP-10 es el agonista de CXCR3 que se expresa en las células Th1 y es un antagonista de CCR3 que se expresa en las células Th2. Por lo tanto, IP-10 podría estar indirectamente involucrado en el efecto antiviral de la terapia cuando los hepatocitos infectados por el VHC secretan IP-10 y reclutan células mononucleares al hígado [240]. Sin embargo, los valores de IP-10 en pacientes infectados por VHC con genotipo 1 también pueden indicar alteraciones en la ruta del interferón. Se ha descrito una mayor inducción de genes "IFN-

stimulated gene" (ISG) a nivel hepático en pacientes con RVS en comparación con los pacientes no-respondedores después de la estimulación in vitro con IFN-alfa [285, 286]. Por otra parte, la escasa respuesta a la terapia del VHC indica una pre-activación del sistema IFN y resulta en algunos defectos en los pasos intermedios de la expresión de ISG, haciéndose refractario al IFN-alfa endógeno (respuesta inmune) y exógeno (terapia) [286]. El IFN-alfa activa la vía Jak-STAT y la mayoría de los pacientes no-respondedores tienen la proteína STAT1 fosforilada y en el núcleo de los hepatocitos antes del tratamiento, y las transcripciones del ISG parecen estar regulados al alza [286]. El gen de IP-10 se activa a través de la vía Jak-STAT resultando en la secreción de IP-10 por la célula. Esta podría ser la causa de que nosotros y otros autores hayamos encontrado elevados valores de IP-10 en sangre periférica de los no-respondedores.

7.2.2. Eotaxina (CCL11).

En el cuarto y último artículo se identificó una asociación entre los niveles basales de Eotaxina (CCL11) con la respuesta virológica al IFN-alfa/RBV en pacientes coinfectados con VIH/VHC. Más concretamente, los pacientes con mayores niveles en plasma de Eotaxina tuvieron más probabilidad de tener respuesta virológica (ETR y RVS). Este hallazgo se confirmó mediante análisis multivariado.

Las quimiocinas cooperan con citoquinas (como IL-13 y TGF-beta) en el desarrollo de la fibrosis[287]. La familia de CC- quimiocinas se ha demostrado que desempeña un importante papel regulador en este proceso pro-fibrótico [288]. Eotaxin (CCL-11), MCP-1 (CCL-2), y MCP-3 (CCL-7) son secretadas por el hígado durante la infección crónica por VHC y estos niveles están fuertemente asociados con el reclutamiento de linfocitos, respuesta inmune y la fibrogénesis [240]. Sin embargo, no se encontró correlación in vitro entre estas CC-quimiocinas y el estadio de la fibrosis

Eotaxina es una quimiocina que atrae selectivamente a eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2 a través de su unión a CCR3 [284]. MCP-3 es un potente agonista de CCR1, CCR2 y CCR3, y por lo tanto bloquea la función de células Th1 [284]. MCP-1 es un potente agonista de CCR2, y por lo tanto participa en la regulación de la infiltración de linfocitos, células dendríticas, macrófagos y células T de memoria, que se enriquecen en el hígado infectado por VHC [289]. Estas quimiocinas pueden reflejar el grado de quimiocinas locales destinados a la señalización CCR2+ y CCR3+ para reclutar linfocitos Th2 durante la inflamación o la respuesta inmune durante la hepatitis crónica C [240].

Los pacientes con un perfil Th2 podrían beneficiarse más del tratamiento VHC, debido a que los elevados niveles de Eotaxina pueden indicar una saludable respuesta inmune Th1 y pre-activación baja de su sistema de interferón, lo que hace que respondan mejor a la terapia con IFN-alfa. Además, el IFN-alfa administrado aumenta el número de células T CD4 + que producen IFN-gamma, y puede favorecer la inducción y mantenimiento de las células Th1 y por lo tanto contrarrestar la respuesta inmune Th2 contra el VHC [290].

Sorprendentemente se ha comprobado que una potente respuesta inmune Th1 es incapaz de eliminar el VHC durante la infección crónica por el VHC, lo que puede indicar una alteración de la respuesta inmune Th1 que hacen que sea difícil conseguir una respuesta virológica efectiva a IFN-alfa/RBV [285, 286]. Así, los niveles elevados de citoquinas estimuladas por interferón en los pacientes respondedores son bajos [291]. Además, los pacientes que no responden a la terapia tienen una pre-activación de su sistema de interferón y tienen algunos defectos en los pasos intermedios de expresión ISG, haciéndolos resistentes tanto a IFN-alfa endógeno como al IFN-alfa de la terapia [286].

Nuestro estudio tiene varias limitaciones: a) el bajo número de pacientes, b) es un estudio retrospectivo, y c) se limita a los pacientes se conservan muy bien la función inmune. La extrapolación a las personas con supresión inmunológica más marcada que requerirá mayor atención.

Conclusiones

8. Conclusiones

- 1) El rendimiento diagnóstico de las concentraciones séricas de HA aumenta gradualmente con el estadio de fibrosis hepática. Sin embargo, el HA supera a otros índices no invasivos simples para el diagnóstico de la cirrosis hepática pero no para la identificación de estadios de fibrosis menos avanzados.
- 2) El HA tiene un alto VPN para descartar cirrosis (99%) pero un bajo VPP para confirmarla (55%). Esto último hace que el interés práctico de la utilización aislada de HA para evaluar la fibrosis hepática en pacientes coinfectados por VIH/VHC en la práctica clínica sea bajo
- 3) La cifra de plaquetas y las concentraciones séricas de ALP, HGF, TIMP-1 y HA fueron marcadores predictivos independientes de fibrosis avanzada en los pacientes coinfectados por VIH/VHC. Además, la combinación de estos marcadores de fibrosis en una función de probabilidad logística condujo a un nuevo índice no-invasivo con buen rendimiento para el diagnóstico de fibrosis avanzada (F3-F4).
- 4) El índice no invasivo HGM-3, al igual que otros índices, predice mejor la ausencia de fibrosis (97% de certeza para F<3) que la presencia de fibrosis significativa (77% de certeza). Aunque HGM-3 mejora la precisión de otros índices publicados, tiene limitaciones en la identificación precisa de los pacientes con fibrosis avanzada (F3-F4).
- 5) Las concentraciones plasmáticas de IP-10 y de eotaxina, antes del inicio del tratamiento del VHC, pueden ser útiles para predecir la respuesta al tratamiento con IFN- α y Ribavirina en pacientes coinfectados por VIH/VHC.
- 6) La cuantificación de quimiocinas aporta información sobre el perfil de la respuesta inmune frente al VHC y podrían jugar algún papel como marcadores de respuesta virológica al tratamiento de la hepatitis C.

Bibliografía

9. Bibliografía

1. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993;57:183-289.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F and et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-871
3. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E and Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224:497-500
4. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM and Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225:840-2
5. CEVIHP. Colaborativo Español para la infección VIH pediátrica. Manual práctico de la infección por VIH en el niño. 2ª ed. Barcelona-Philadelphia, 2000 (Prous-Scisnce, ed).
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC. The etiologic agent of AIDS. *Mt Sinai J Med* 1986;53:598-608
7. Lewis P, Hensel M and Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 1992;11:3053-8
8. Martin JC, Bandres JC. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22:413-29
9. Soriano V, Hoz. JG-L. Manual del Sida. 6ª ed. In: Permanyer P, ed. Manual del Sida. Barcelona, 2005
10. Sierra S, Kupfer B and Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* 2005;34:233-44
11. Forsell MN, Li Y, Sundback M, et al. Biochemical and immunogenic characterization of soluble human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers expressed by semliki forest virus. *J Virol* 2005;79:10902-14
12. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG and Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* 2003;22:1707-15
13. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998;67:1-25
14. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991;324:308-17
15. Overbaugh J, Miller AD and Eiden MV. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:371-89, table of contents
16. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J and Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998;393:648-59
17. Tamamura H, Otaka A and Fujii N. Development of anti-HIV agents targeting dynamic supramolecular mechanism: entry and fusion inhibitors based on CXCR4/CCR5 antagonists and gp41-C34-remodeling peptides. *Curr HIV Res* 2005;3:289-301

18. Dragic T, Litwin V, Allaway G and et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-673
19. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S and et al. lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984;312:767-76856
20. Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988;240:1427-35
21. Popov S, Rexach M, Zybarth G, et al. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 1998;17:909-17
22. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999;285:1-32
23. Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 2009;6:51
24. Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM and Siliciano RF. Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *J Virol* 2003;77:1659-65
25. Simon V, Ho DD and Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 2006;368:489-504
26. Alcamí J, Coiras M. [Immunopathogenesis of HIV infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:216-26
27. Brelot A, Alizon M. HIV-1 entry and how to block it. *AIDS* 2001;15 Suppl 5:S3-11
28. Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol* 1997;62:20-9
29. Amatruda TT, 3rd, Gerard NP, Gerard C and Simon MI. Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins. *J Biol Chem* 1993;268:10139-44
30. Raport C, Gosling J, Schweickart V, Gray P and Charo I. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 1996;271:17161-17166
31. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833-5
32. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998;280:1884-8
33. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, et al. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* 1998;160:3933-41
34. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1996;184:2433-8
35. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, et al. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp Med* 1993;178:1067-76
36. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998;28:2760-9
37. Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W and Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 1998;72:2733-7
38. Lin CL, Sewell AK, Gao GF, Whelan KT, Phillips RE and Austyn JM. Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendritic cell chemotaxis. *J Exp Med* 2000;192:587-94

39. Sewell AK, Price DA. Dendritic cells and transmission of HIV-1. *Trends Immunol* 2001;22:173-5
40. Knight SC. Dendritic cells and HIV infection; immunity with viral transmission versus compromised cellular immunity? *Immunobiology* 2001;204:614-21
41. MacDougall TH, Shattock RJ, Madsen C, Chain BM and Katz DR. Regulation of primary HIV-1 isolate replication in dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2002;127:66-71
42. Donaghy H, Gazzard B, Gotch F and Patterson S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 2003;101:4505-11
43. Hart TK, Truneh A and Bugelski PJ. Characterization of CD4-gp120 activation intermediates during human immunodeficiency virus type 1 syncytium formation. *Science* 1996;273:1797-8
44. Chesebro B, Nishio J, Perryman S, et al. Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *J Virol* 1991;65:5782-9
45. Shioda T, Levy JA and Cheng-Mayer C. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9434-8
46. Sleasman JW, Goodenow MM. 13. HIV-1 infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003;111:582-592
47. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009;15:871-2
48. Holguin A, Alvarez A and Soriano V. High prevalence of HIV-1 subtype G and natural polymorphisms at the protease gene among HIV-infected immigrants in Madrid. *AIDS* 2002;16:1163-70
49. Sa-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A and Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors. *Transfusion* 2007;47:97-102
50. Holguin A, Ramirez de Arellano E, Rivas P and Soriano V. Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev* 2006;8:98-107
51. Pineiro Perez R, Mellado Pena MJ, Holguin A, et al. [HIV-1 genetic variability in non Spaniard infected children]. *An Pediatr (Barc)* 2009;70:20-6
52. UNAIDS. Report on the Global AIDS epidemic., 2008
53. Goedert JJ, Kessler CM, Aledort LM, et al. A prospective study of human immunodeficiency virus type 1 infection and the development of AIDS in subjects with hemophilia. *N Engl J Med* 1989;321:1141-8
54. Kurth AE, Celum C, Baeten JM, Vermund SH and Wasserheit JN. Combination HIV prevention: significance, challenges, and opportunities. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011;8:62-72
55. Pedraza MA, del Romero J, Roldan F, et al. Heterosexual transmission of HIV-1 is associated with high plasma viral load levels and a positive viral isolation in the infected partner. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:120-5
56. Schoenbaum EE, Hartel D, Selwyn PA, et al. Risk factors for human immunodeficiency virus infection in intravenous drug users. *N Engl J Med* 1989;321:874-9

57. ONUSIDA. Un enfoque estratégico: el VIH y el SIDA y la EDUCACION, 2009
58. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ and Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis* 2006;6:726-32
59. UNAIDS. UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC In: Library W, ed. unaids.org, 2010
60. Epidemiología. IdSCICNd. Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Actualización a 30 de Junio de 2010., 2010
61. Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991;5:1-14
62. Gaines H, von Sydow MA, von Stedingk LV and et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 1990;4:995-999
63. Clark SJ, Saag MS, Decker WD and et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991;324:954-960
64. Ho DD, Moudgil T and Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989;321:1673-5
65. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650-5
66. Kinloch-de Loes S, Perrin L. Therapeutic interventions in primary HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;10:S77-82
67. Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen Virol* 2001;82:1807-14
68. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA and Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-70
69. Gurunathan S, Habib RE, Baglyos L, et al. Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. *Vaccine* 2009;27:1997-2015
70. Holland JJ. Transitions in understanding of RNA viruses: a historical perspective. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;299:371-401
71. Schwartz SA, Nair MP. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:295-305
72. Soriano V, Perelson AS and Zoulim F. Why are there different dynamics in the selection of drug resistance in HIV and hepatitis B and C viruses? *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1-4
73. Yerly S, Junier T, Gayet-Ageron A, et al. The impact of transmission clusters on primary drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *AIDS* 2009;23:1415-23
74. Nabel GJ, Sullivan NJ. Antibodies and resistance to natural HIV infection. *N Engl J Med* 2000;343:1263-5
75. Chang TL, Klotman ME. Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS Rev* 2004;6:161-8
76. Ding J, Rapista A, Telezhova N, Lu W, Klotman ME and Chang TL. Mucosal human defensins 5 and 6 antagonize the anti-HIV activity of candidate polyanion microbicides. *J Innate Immun* 2010;3:208-12
77. Lehrer RI. Multispecific myeloid defensins. *Curr Opin Hematol* 2007;14:16-21

78. Miedema F. T cell dynamics and protective immunity in HIV infection: a brief history of ideas. *Curr Opin HIV AIDS* 2006;1:1-2
79. Saez-Cirion A, Lacabartz C, Lambotte O, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6776-81
80. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrin J and Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201-8
81. Wei X, Decker JM, Wang S, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307-12
82. Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J and Siliciano RF. The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med* 2004;10:525-31
83. Laborda CV. Factores genéticos del huésped, riesgo de infección y de progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Facultat de Medicina. Departament de Medicina i Cirurgia. Tarragona: UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI, 2009
84. Johnson WE, Sawyer SL. Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics* 2009;61:163-76
85. Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 2008;5:51
86. von Schwedler U, Song J, Aiken C and Trono D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 1993;67:4945-55
87. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995;267:538-9
88. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362:355-8
89. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM and Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-6
90. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM and Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996;271:1592-4
91. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD and et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* 1996;335:1081-1090
92. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA and et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4686-4690
93. Deeks SG, Smith M, Holodniy M and Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA* 1997;277:145-153
94. Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 2003;362:22-9
95. Greenberg M, Cammack N, Salgo M and Smiley L. HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev Med Virol* 2004;14:321-37
96. Society EAC. Guidelines for the Clinical Management and Treatment of HIV Infected Adults in Europe, 2008

97. Chun TW, Fauci AS. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *AIDS*;26:1261-8
98. Cane PA. Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:537-42
99. Quinones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist Updat* 2002;5:224-33
100. Calmy A, Pascual F and Ford N. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004;350:2720-1
101. Temesgen Z, Cainelli F, Poeschla EM, Vlahakis SA and Vento S. Approach to salvage antiretroviral therapy in heavily antiretroviral-experienced HIV-positive adults. *Lancet Infect Dis* 2006;6:496-507
102. LePrevost M, Green H, Flynn J, et al. Adherence and acceptability of once daily Lamivudine and abacavir in human immunodeficiency virus type-1 infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:533-7
103. Ramos JT, de Jose MI, Polo R, et al. [Recommendations of the CEVIHP/SEIP/AEP/PNS on antiretroviral treatment in HIV-infected children and teenagers]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:279-312
104. Resino S, Bellón JM, Ramos JT, et al. Salvage antiretroviral therapy in HIV-infected children: advantages of lopinavir-ritonavir. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:923-930
105. <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/PediatricGuidelines.pdf>. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection, 2006
106. Ananworanich J, Hill A, Siangphoe U, et al. A prospective study of efficacy and safety of once-daily saquinavir/ritonavir plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in treatment-naïve Thai patients. *Antivir Ther* 2005;10:761-7
107. Nguyen H, Sankaran S and Dandekar S. Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* 2006;354:58-68
108. Bartosch B, Thimme R, Blum HE and Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2009;51:810-20
109. Buranasin P, Kunakorn M, Petchclai B, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in breast milk and colostrum of seropositive mothers. *J Med Assoc Thai* 1993;76:41-5
110. Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006;348:1-12
111. Anthony S. Fauci EB DLK, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo Harrison's Principles of Internal Medicine. In: IARR TM-HC, ed. 17 ed, 2009
112. You S, Stump DD, Branch AD and Rice CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004;78:1352-66
113. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ and Hellen CU. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998;12:67-83
114. Cook GA, Opella SJ. NMR studies of p7 protein from hepatitis C virus. *Eur Biophys J* 2009
115. Chen S, Wang YM. Evolutionary study of hepatitis C virus envelope genes during primary infection. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:2174-80

116. Li HF, Huang CH, Ai LS, Chuang CK and Chen SS. Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry. *J Biomed Sci* 2009;16:89
117. Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:29-38
118. Kantzanou M, Lucas M, Barnes E, et al. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 2003;85:165-71
119. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801-5
120. Diedrich G. How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J* 2006;273:3871-85
121. Cocquerel L, Voisset C and Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 2006;87:1075-84
122. Brass V, Moradpour D and Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* 2006;3:29-34
123. De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:47-53
124. Guarner C. Hepatitis C. In: ICG Marge S, ed. *Avances en Patología Digestiva 4*. Barcelona, 2009:253
125. Moradpour D, Brass V, Gosert R, Wolk B and Blum HE. Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. *Trends Mol Med* 2002;8:476-82
126. Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 1999;73:9718-25
127. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81:1631-48
128. Dusheiko G, Simmonds P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J Viral Hepat* 1994;1:3-15
129. Colina R, Casane D, Vasquez S, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2004;85:31-7
130. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006;3:35-40
131. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;299:261-84
132. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M and Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5547-51
133. The Global Burden of Hepatitis CWG. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2004;44:20-29
134. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I and Preston S. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000;40:143-59

135. CfDCaP C. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. MMWR Recomm Rep 1998; 1998;47:1-39
136. Thompson ND, Perz JF, Moorman AC and Holmberg SD. Nonhospital health care-associated hepatitis B and C virus transmission: United States, 1998-2008. Ann Intern Med 2009;150:33-9
137. Tedaldi EM, Hullsiek KH, Malvestutto CD, et al. Prevalence and characteristics of hepatitis C virus coinfection in a human immunodeficiency virus clinical trials group: the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. Clin Infect Dis 2003;36:1313-7
138. Toro Rueda C, Ramos Blazquez B and Soriano Vazquez V. [Diagnostic, clinical and therapeutic implications of viral hepatitis in HIV-infected patients]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006;24 Suppl 1:30-5
139. CDC. Sexual Transmission of Hepatitis C Virus Among HIV-Infected Men Who Have Sex with Men --- New York City, 2005--2010. Weekly. Vol. 60, 2011
140. Yeung KS, Meanwell NA, Qiu Z, et al. Structure-activity relationship studies of a bisbenzimidazole-based, Zn(2+)-dependent inhibitor of HCV NS3 serine protease. Bioorg Med Chem Lett 2001;11:2355-9
141. Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, et al. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. J Virol 2001;75:1229-35
142. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. Trends Microbiol 2004;12:96-102
143. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 2005;42:962-73
144. Gonzalez-Casas R, Trapero-Marugan M and Moreno-Otero R. [Chronic C hepatitis genotype 4.]. Med Clin (Barc) 2010;137:31-35
145. Garcia-Retortillo M, Forns X. [Genomic variability and natural history of hepatitis C virus infection]. Gastroenterol Hepatol 2002;25:514-20
146. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. J Gen Virol 2004;85:3173-88
147. Pang PS, Planet PJ and Glenn JS. The evolution of the major hepatitis C genotypes correlates with clinical response to interferon therapy. PLoS One 2009;4:e6579
148. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev 2000;13:223-35
149. Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. Gastroenterology 1983;85:439-62
150. Hofer H, Watkins-Riedel T, Janata O, et al. Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. Hepatology 2003;37:60-4
151. Maheshwari A, Ray S and Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. Lancet 2008;372:321-32
152. Abaira García LGS, Alberto.Guillán Pavón, Begoña. Otero Antón, Esteban.Suárez López, Francisco. . Guia de Practica Clínica de la Hepatitis C. In: Salud. XdGCdSDdASSGd, ed. Santiago de Compostela, 2009

153. Myrmel H, Ulvestad E and Asjo B. The hepatitis C virus enigma. *APMIS* 2009;117:427-39
154. Poynard T, Morra R, Ingiliz P, et al. Biomarkers of liver fibrosis. *Adv Clin Chem* 2008;46:131-60
155. WHO Mc. Hepatitis c, 2011
156. Heller T, Reherrmann B. Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* 2005;25:7-17
157. Alberti A, Benvegna L, Boccato S, Ferrari A and Sebastiani G. Natural history of initially mild chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis* 2004;36:646-54
158. Puoti C, Bellis L, Galossi A, et al. Antiviral treatment of HCV carriers with persistently normal ALT levels. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:150-2
159. Sanai FM, Benmoussa A, Al-Hussaini H, et al. Is serum alanine transaminase level a reliable marker of histological disease in chronic hepatitis C infection? *Liver Int* 2008;28:1011-8
160. Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M, et al. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 2001;34:283-7
161. Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:1334-40
162. Wurstthorn K, Manns MP and Wedemeyer H. Natural history: the importance of viral load, liver damage and HCC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008;22:1063-79
163. Davis GL, Alter MJ, El-Serag H, Poynard T and Jennings LW. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology* 2009;138:513-21, 521 e1-6
164. Patel A, Harrison SA. Hepatitis C virus infection and nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2012;8:305-12
165. Del Campo JA, Romero-Gomez M. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: a way out for the virus? *World J Gastroenterol* 2009;15:5014-9
166. Fausto N, Campbell JS and Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45-53
167. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18
168. Iredale J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair. *Pharmacol Res* 2008;58:129-36
169. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-50
170. Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19:397-410
171. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL and Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-74
172. Castera L, Bedossa P. How to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C: serum markers or transient elastography vs. liver biopsy? *Liver Int* 2011;31 Suppl 1:13-7
173. Resino S, Sanchez-Conde M and Berenguer J. Coinfection by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus: noninvasive assessment and staging of fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2012

174. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93
175. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S38-53
176. Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:1670-81
177. Bedossa P, Dargere D and Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:1449-57
178. Cadranel JF, Rufat P and Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology* 2000;32:477-81
179. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-50
180. Ahmad W, Ijaz B, Gull S, et al. A brief review on molecular, genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation. *Virol J* 2011;8:53
181. Leroy V, Monier F, Bottari S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271-9
182. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-13
183. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-42
184. Kelleher TB, Mehta SH, Bhaskar R, et al. Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *J Hepatol* 2005;43:78-84
185. Valva P, Casciato P, Diaz Carrasco JM, et al. The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. *PLoS One* 2011;6:e23218
186. Berenguer J, Bellon JM, Miralles P, et al. Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. *J Viral Hepat* 2007;14:859-69
187. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-92
188. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-26
189. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y and Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-75
190. Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F, et al. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients. *Aids* 2003;17:721-5

191. Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, et al. Care of patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel. *AIDS* 2007;21:1073-89
192. Gane EJ. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl* 2008;14 Suppl 2:S36-44
193. John-Baptiste A, Krahn M, Heathcote J, Laporte A and Tomlinson G. The natural history of hepatitis C infection acquired through injection drug use: meta-analysis and meta-regression. *J Hepatol* 2010;53:245-51
194. Thein HH, Yi Q, Dore GJ and Krahn MD. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *AIDS* 2008;22:1979-91
195. Poynard T, Bedossa P and Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-32
196. Wright M, Goldin R, Fabre A, et al. Measurement and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross sectional and longitudinal study. *Gut* 2003;52:574-9
197. Shi L, Reid L, Jones W, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2006;24:1151-61
198. Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, Waked I and Taylor-Robinson SD. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009;15:1301-14
199. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52
200. Deuffic S, Poynard T, Buffat L and Valleron A. Trends in primary liver cancer. *Lancet.* 1998;351:214-5
201. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A and Castagnetta L. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:13-20
202. Fried M, Shiffman M, Reddy K, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347:975-82
203. Manns M, McHutchison J, Gordon S, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* 2001;358:958-65
204. Chung RT, Gale M, Jr., Polyak SJ, Lemon SM, Liang TJ and Hoofnagle JH. Mechanisms of action of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008;47:306-20
205. Kronenberger B, Ruster B, Elez R, et al. Interferon alfa down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:1518-26
206. Katze MG, He Y and Gale M, Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:675-87
207. Ogawa K, Hige S, Nakanishi M, et al. Immunological and mutagenic actions of ribavirin monotherapy preceding combination therapy with interferon for patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2009;14:513-22

208. Gish RG. Treating HCV with ribavirin analogues and ribavirin-like molecules. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:8-13
209. Pisani G, Cristiano K, Marino F, et al. Quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in a multicenter study: implications for management of HCV genotype 1-infected patients. *J Clin Microbiol* 2009;47:2931-6
210. Deltenre P. Virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Acta Gastroenterol Belg* 2009;72:421-4
211. Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12
212. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-27
213. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;364:2405-16
214. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1195-206
215. Soriano V, Poveda E, Vispo E, Labarga P, Rallon N and Barreiro P. Pharmacogenetics of hepatitis C. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:523-9
216. Thompson AJ, McHutchison JG. Will IL28B polymorphism remain relevant in the era of direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus? *Hepatology* 2012;56:373-81
217. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801
218. Clark PJ, Thompson AJ and McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol* 2010;106:38-45
219. Melis R, Fauron C, McMillin G, et al. Simultaneous genotyping of rs12979860 and rs8099917 variants near the IL28B locus associated with HCV clearance and treatment response. *J Mol Diagn* 2011;13:446-51
220. Labarga P, Soriano V, Caruz A, et al. Association between IL28B gene polymorphisms and plasma HCV-RNA levels in HIV/HCV-co-infected patients. *AIDS* 2011;25:761-6
221. Rallon NI, Restrepo C, Naggie S, et al. Interleukin-28B gene polymorphisms do not influence the susceptibility to HIV-infection or CD4 cell decline. *AIDS* 2011;25:269-71
222. Thompson AJ. Genetic factors and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2012;142:1335-9
223. Mallolas Masferrer J, Martinez-Rebollar M and Laguno Centeno M. [Treatment of hepatitis C virus in HIV-positive patients]. *Gastroenterol Hepatol* 2011;34:558-67
224. Lopez-Dieguez M, Montes ML, Pascual-Pareja JF, et al. The natural history of liver cirrhosis in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2011;25:899-904
225. Soriano AR-SyV. Coinfección por el VIH y el virus de la hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24(5):335-46 2006;24(5):335-46
226. Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1

expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2010;52:612-22

227. Macias J, Berenguer J, Japon MA, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology* 2009;50:1056-63

228. Berenguer J, Alejos B, Hernando V, et al. Trends in mortality according to hepatitis C virus serostatus in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2012

229. Pol S, Soriano V. Management of chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2008;47:94-101

230. Soriano V, Vispo E, Labarga P, Medrano J and Barreiro P. Viral hepatitis and HIV co-infection. *Antiviral Res* 2009;85:303-15

231. Taylor LE, Swan T and Mayer KH. HIV Coinfection With Hepatitis C Virus: Evolving Epidemiology and Treatment Paradigms. *Clin Infect Dis* 2012;55 Suppl 1:S33-42

232. Sulkowski MS, Benhamou Y. Therapeutic issues in HIV/HCV-coinfecting patients. *J Viral Hepat* 2007;14:371-86

233. Vrolijk JM, Kwekkeboom J, Janssen HL, et al. Pretreatment intrahepatic CD8+ cell count correlates with virological response to antiviral therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;188:1528-32

234. Labarga P, Soriano V, Vispo ME, et al. Hepatotoxicity of antiretroviral drugs is reduced after successful treatment of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 2007;196:670-6

235. Alberti A, Clumeck N, Collins S, et al. Short statement of the first European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients. *J Hepatol* 2005;42:615-24

236. Dorrucci M, Pezzotti P, Grisorio B, et al. Time to discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy regimen: a comparison between protease inhibitor- and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimens. *AIDS* 2001;15:1733-6

237. Alatrakchi N, Graham CS, Van der Vliet J, Sherman KE, Exley MA and Koziel MJ. Hepatitis C virus (HCV) specific CD8+ cells produce TGF-beta that can suppress HCV-specific T cell responses. *J Virol* 2007

238. Verma S. HAART attenuates liver fibrosis in patients with HIV/HCV co-infection: fact or fiction? *J Antimicrob Chemother* 2006;58:496-501

239. Castera L. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:291-303

240. Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology* 2009;49:676-88

241. Wald O, Weiss ID, Galun E and Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007;39:50-62

242. Berenguer J, Alvarez-Pellicer J, Martin PM, et al. Sustained virological response to interferon plus ribavirin reduces liver-related complications and mortality in patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Hepatology* 2009;50:407-13

243. Resino S, Alonso Arias R, Jiménez JL, Gurbindo D and Muñoz-Fernández MA. Determinación de la carga viral para el diagnóstico precoz de la infección perinatal por VIH-1. *An Esp Pediat* 1998;60:64
244. Jacobs WH, Goldberg SB. Statement on outpatient percutaneous liver biopsy. *Dig Dis Sci* 1989;34:322-3
245. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF and Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9
246. Ryan P, Berenguer J, Michelaud D, et al. Insulin resistance is associated with advanced liver fibrosis and high body mass index in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50:109-10
247. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2010;6:425-56
248. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-9
249. Lichtinghagen R, Bahr MJ. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:715-26
250. Thuluvath PJ, Krok KL. Noninvasive markers of fibrosis for longitudinal assessment of fibrosis in chronic liver disease: are they ready for prime time? *Am J Gastroenterol* 2005;100:1981-3
251. Zeremski M, Talal AH. Noninvasive markers of hepatic fibrosis: are they ready for prime time in the management of HIV/HCV co-infected patients? *J Hepatol* 2005;43:2-5
252. Parkes J, Guha IN, Roderick P and Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:462-74
253. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-55
254. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1160-74
255. Trang T, Petersen JR and Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta* 2008;397:51-4
256. Macias J, Giron-Gonzalez JA, Gonzalez-Serrano M, et al. Prediction of liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients by simple non-invasive indexes. *Gut* 2006;55:409-14
257. Loko MA, Castera L, Dabis F, et al. Validation and comparison of simple noninvasive indexes for predicting liver fibrosis in HIV-HCV-coinfected patients: ANRS CO3 Aquitaine cohort. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1973-80
258. Tural C, Tor J, Sanvisens A, et al. Accuracy of Simple Biochemical Tests in Identifying Liver Fibrosis in Patients Co-Infected With Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;7:339-45
259. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, et al. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008;48:765-73

260. Cales P, de Ledinghen V, Halfon P, et al. Evaluating the accuracy and increasing the reliable diagnosis rate of blood tests for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2008;28:1352-62
261. Kontorinis N, Dieterich D. Hepatotoxicity of antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 2003;5:36-43
262. Bonacini M. Liver injury during highly active antiretroviral therapy: the effect of hepatitis C coinfection. *Clin Infect Dis* 2004;38 Suppl 2:S104-8
263. Cole JL, Marzec UM, Gunthel CJ, et al. Ineffective platelet production in thrombocytopenic human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood* 1998;91:3239-46
264. Mallewa JE, Wilkins E, Vilar J, et al. HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:648-60
265. Samaras K. Metabolic consequences and therapeutic options in highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:238-45
266. Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, Rawlins SR, Sanderson SO and Levine RA. Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, FIBROSpect II, and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2008;103:928-36
267. Nunes D, Fleming C, Offner G, et al. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-44
268. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002;9:128-33
269. Sene D, Limal N, Messous D, et al. Biological markers of liver fibrosis and activity as non-invasive alternatives to liver biopsy in patients with chronic hepatitis C and associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Clin Biochem* 2006;39:715-21
270. Larrousse M, Laguno M, Segarra M, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;46:304-11
271. Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, et al. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol* 2005;4:6
272. Resino S, Sanchez-Conde M and Berenguer J. Coinfection by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus: noninvasive assessment and staging of fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:564-9
273. Halfon P, Bacq Y, De MA, et al. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:395-402
274. Asano Y, Iimuro Y, Son G, Hirano T and Fujimoto J. Hepatocyte growth factor promotes remodeling of murine liver fibrosis, accelerating recruitment of bone marrow-derived cells into the liver. *Hepatol Res* 2007;37:1080-94
275. de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, et al. Diagnosis of Hepatic Fibrosis and Cirrhosis by Transient Elastography in HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:175-179
276. Forns X, Ampurdanes S, Sanchez-Tapias JM, et al. Long-term follow-up of chronic hepatitis C in patients diagnosed at a tertiary-care center. *J Hepatol* 2001;35:265-71

277. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006;43:1317-25
278. McGovern BH. Hepatitis C in the HIV-infected patient. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45 Suppl 2:S47-56; discussion S66-7
279. Lagging M, Romero AI, Westin J, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44:1617-25
280. Romero AI, Lagging M, Westin J, et al. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006;194:895-903
281. Diago M, Castellano G, Garcia-Samaniego J, et al. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2006;55:374-9
282. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther* 2008;13:969-76
283. Zeremski M, Markatou M, Brown QB, Dorante G, Cunningham-Rundles S and Talal AH. Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:262-8
284. Moser B, Wolf M, Walz A and Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004;25:75-84
285. Younossi ZM, Baranova A, Afendy A, et al. Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin. *Hepatology* 2009;49:763-74
286. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7034-9
287. Lin W, Weinberg EM and Chung RT. Pathogenesis of accelerated fibrosis in HIV/HCV co-infection. *J Infect Dis* 2013;207 Suppl 1:S13-8
288. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004;4:583-94
289. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829-41
290. Davis AM, Hagan KA, Matthews LA, et al. Blockade of virus infection by human CD4+ T cells via a cytokine relay network. *J Immunol* 2008;180:6923-32
291. Polyak SJ. Hepatitis C virus--cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis* 2003;7:67-88